

Компьютерное моделирование взаимодействия белков-мишеней с катионными пептидами, индуцирующими апоптоз опухолевых клеток

Н.А. Королева^{1,2}, О.Г. Ковтун^{1,2}, Б.В. Шилов¹, А.А. Лушникова²

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина

Введение

Ежегодно в мире фиксируется около 20 миллионов новых случаев рака, из которых половина случаев с летальным исходом вследствие поздней диагностики, приобретенной в процессе лечения лекарственной устойчивости и недостаточно эффективной противоопухолевой терапии. Для решения этих проблем необходим поиск новых противоопухолевых агентов, которые могут служить маркерами опухолевого роста, избирательно блокировать пролиферацию опухолевых клеток, ингибировать неоангиогенез и метастазирование.

Катионные пептиды (КП) являются перспективными противоопухолевыми соединениями широкого спектра действия, с низкой иммуногенностью и малой вероятностью возникновения опухолей, резистентных к КП. Их преимущества заключаются в относительно невысокой стоимости синтеза, быстром проникновении в клетки, избирательной цитотоксичности [1].

Преимущественная гибель опухолевых клеток под воздействием КП обусловлена структурными особенностями мембран злокачественных клеток, которые заряжены отрицательно и несут на поверхности целый ряд специфичных молекулярных маркеров, включая рецепторы факторов роста и шаперонный белок нуклеолин (NCL). NCL и другой шаперонный белок нуклеофозмин (NPM) обычно высоко экспрессированы в ядрах опухолевых клеток и в цитозоле. Эти белки регулируют важнейшие для жизнедеятельности клеток функции, включая сигналинг, пролиферацию, инвазивный рост, поэтому они играют существенную роль в механизмах канцерогенеза [1, 2, 3]

Избирательная цитотоксичность катионных пептидов обусловлена их связыванием с активными центрами NCL и NPM и последующим ингибированием важнейших клеточных функций, запуском гибели опухолевых клеток путем ядрышкового стресса и апоптоза. Эти процессы сопровождаются миграцией молекул NPM из ядра в цитоплазму с последующей фрагментацией хроматина, нарушением структуры клеточного ядра и активацией некоторых каспаз.^[2]

Молекулярный докинг позволяет подтвердить возможность связывания потенциальных противоопухолевых препаратов с белками-мишенями и предположение об избирательной цитотоксичности КП. Представление о механизмах действия КП и результатах их воздействия на клетку, позволяет моделировать и модифицировать молекулярную структуру пептидов и их соединений для достижения высокого противоопухолевого потенциала.

В ходе исследования выяснилось, что молекулы изучаемых пептидов оказались слишком большими для стыковки с предполагаемыми мишенями. Поэтому мы предложили две стратегии:

1. Фрагментировать молекулы КП согласно каноническим сайтам протеолиза, получая крупные пептидные фрагменты. Затем с помощью стандартного алгоритма молекулярного докинга «ligand-protein docking» определить их оценочные функции (scores) при взаимодействии с белками-мишенями, в частности – NCL и NPM.^[4]

2. Восстановить возможные вторичные структуры полипептидов и оценить взаимодействия между белками путем «protein-protein docking».

Цель данного исследования: обосновать избирательность воздействия катионных пептидов на опухолевые клетки с использованием двух указанных выше стратегий попарного молекулярного докинга.

Материалы и методы

Катионные пептиды синтезированы с помощью твердофазного метода cFmoc в ФБГУ Институт иммунологии ФМБА России. Их основные характеристики представлены в таблице 1.

В качестве белков-мишеней для молекулярного моделирования были выбраны гиперэкспрессированные в опухолевых клетках шаперонные белки NCL и NPM, их молекулярные структуры получены из открытой базы данных PDB (ProteinDataBank): нуклеолин (2KRR), нуклеофозмин (2P1B).

Первый этап подготовки белков включал протонирование (pH=7,0), удаление воды и иных растворителей, однократную минимизацию структур с помощью силового поля OPLS3. Активные центры белков-мишеней проанализированы в программе Sitemap, платформы Maestro 11 (Schrodinger Inc). Процедура подготовки лиганда включала: графическое представление молекулы с помощью приложения MarvinSketch (Chemaxon), протонирование (pH=7,0) и определение возможных конформеров в программе Maestro 11 (LigPrep). Для реализации второй стратегии использовали

открытый сервер Jnet: 2.3.1 и программу PyMOL, что позволило представить вторичную структуру аминокислотной последовательности изучаемых пептидов. Для количественной оценки взаимодействий между клеточными белками-мишенями и КП использованы платформа Maestro 11 (Schrödinger Inc.) и открытый сервер ZDOCK. В открытом сервере ZDOCK мы выбрали следующие параметры: фиксированный неподвижный рецептор и взаимодействие лигандов с аминокислотными остатками, составляющими активный центр белка.

Результаты и заключение

Попарный молекулярный докинг, выполненный с помощью программы Maestro 11 показывает, что энергия связи между пептидами и выбранными белками-мишенями превышает по модулю 6,50 (ккал/моль). Это означает, что данные пептиды достаточно прочно связываются с активным центром белка-мишени посредством водородных связей с относительно небольшими затратами энергии на их образование [5].

Полученные нами результаты оценки белок-белкового взаимодействия, выраженные в виде совокупности сил электростатики, статистического потенциала IFACE и комплементарности форм, близки к 1000. Это свидетельствует о взаимодействии между молекулами выбранных белков [6].

Оценка взаимодействия предполагаемых белков-мишеней и КП показала, что изучаемые катионные пептиды NC-783 и AM-2 могут прицельно связываться с белками-мишенями в опухолевых клетках с последующей индукцией апоптоза. Полученные результаты подтверждаются в серии экспериментов *in vitro* на клеточных моделях.

Таблица 1. Характеристика катионных пептидов.

№	Пептид	Формула	Молекулярная масса, Да/заряд
1	AM - 2	Mir-KRPARPAR-NH ₂	1391/4+
2	NC-783	KRRGGGKLLKLLKLLKLLKC	2505/9+

Таблица 2. Результаты компьютерного моделирования.

Метод	protein-protein docking, электростатический потенциал		ligand-docking, docking score	
	Белок-мишень	Пептид	Нуклеолин (2KRR)	Нуклеофозмин (2P1B)
		Нуклеолин (2KRR)	Нуклеофозмин (2P1B)	
	AM 2	945	941	- 8,2
	NC 783	1241	1108	- 7,2

Литература

1. Hilchie A.L., Sharon A., Haney E., Hoskin D. et al Mastoparan is a membranolytic anti-cancer peptide that works synergistically with gemcitabine in a mouse model of mammary carcinoma // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* – 2016. – Vol.1858.
2. Пократова Д.А., Лушникова А.А., Рудакова А.А. и др. Механизм гибели опухолевых клеток в различных культурах, индуцированный катионными пептидами // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2018. – Т. 17. – № 5. – С. 58-59.
3. Yangngam S., Prasopsiri J., Hatthakarnkul P. et al. Cellular localization of nucleolin determines the prognosis in cancers: a metaanalysis// *J Mol Med.* – 2022. Vol. 100. – P. 1145–1157.
4. Lushnikova A.A. Simulation binding between nucleoli and cationic peptides, inducing tumor cell apoptosis, by molecular docking / Lushnikova A.A, Kostarev A.V, Onyan A.V, et al. // *J. Cancer Prev. Curr. Res. MedCrave Publishing.* - 2018. - Vol. 9. - №4. - P. 187-189.
5. Friesner R.A., Banks J.L. et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 2004. – Vol. 47. - №7. – P.1739-1749.
6. Pierce B.G., Wiehe K., Hwang H., Kim B.H., Vreven T., Weng Z. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers // *Bioinformatics (Oxford, England)/* - 2014. - Vol. 30. - №.12. – P.1771-1773.

Изучение меж- и внутрисубтипной рекомбинации в гене гемагглютинаина субтипов вируса гриппа H1, H2, H5

А.М. Подвальный, А.А. Девяткин

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Рекомбинация является широко распространенным явлением у вирусов и может оказать большое влияние на их эволюцию [1]. Рекомбинация приводит к расширению круга вирусных хозяев, появлению новых рекомбинантных вирусов, изменению специфичности векторов передачи, повышению вирулентности и патогенеза, модификации тканевых тропизмов, уклонению от иммунитета хозяина и эволюции резистентности к противовирусным препаратам.

Вирус гриппа А является одним из патогенов, представляющих значимую пандемическую угрозу. Этот вид вирусов принадлежит семейству Orthomyxoviridae. Таксономия субтипов вирусов гриппа А основана на сравнении между собой разных групп поверхностных белков - гемагглютинаина (HA) и нейраминидазы (NA). В дополнение к генам, кодирующим HA и NA, в геноме вирусов гриппа А имеется восемь других кодирующих генов. Гены HA и NA кодируют поверхностные гликопротеины, которые являются основными мишенями антител, синтезирующихся в организме хозяина. Изучение рекомбинации генов HA и NA улучшит понимание генетического разнообразия вирусов гриппа А, что необходимо для разработки вакцин от этих вирусов.

В данном исследовании было изучена возможность рекомбинаций внутри гена HA для нескольких субтипов вируса гриппа А (H1, H2, H5). Нуклеотидные последовательности всех вирусов гриппа А, принадлежащие выбранным субтипам, были получены из базы данных Genbank. Выравнивание сиквенсов проводили при помощи алгоритма MAFFT. Поиск следов рекомбинации выполняли при помощи библиотеки RecDplot, реализованной в программной среде R [2]. Филогенетические деревья строили при помощи алгоритма присоединения соседей, имплементированного в программное обеспечение MEGA7. Общей методологии выполнения работы соответствовала протоколу, применённому на другом объекте [3].

В результате были обнаружены вирусы с возможными рекомбинациями. После построения филогенетических деревьев для выбранных участков генома были выявлены вирусы со следами рекомбинации, принадлежащие субтипу H1 ((A/Puerto Rico/8-RGcH1-1/1934(H1N1), A/swine/South Dakota/A01267992/2012(H1N1), A/Iran/1417/2016(H1N1)) и H5(A/Puerto Rico/8-RGcH5-1/1934(H5N1), A/mallard duck/New Zealand/NZ0700316-53c/2007(H5N2), A/Kenya/63/2010(H1N1)). Иначе говоря, была обнаружена внутрисубтипная рекомбинация в гене гемагглютинаина субтипов вируса гриппа H1 и H5. Кроме того, были выявлены следы межсубтипной рекомбинации между субтипами H1, H2 и H5. Следует отметить, что достоверные филогенетические реконструкции можно выполнять только на нерекombинирующих участках генома, что необходимо учитывать при реконструкции таксономических взаимоотношений между вирусами гриппа.

Работа была поддержана грантом РФФ 22-74-10032

Литература

1. Pérez-Losada M., Arenas M., Galán J.C., Palero F., González-Candelas F. Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences// DOI: 10.1016/j.meegid.2014.12.022
2. Vakulenko Y., Deviatkin A., Drexler, J.F., Lukashov A. Modular Evolution of Coronavirus Genomes, Viruses, (2021) doi: 10.3390/v13071270
3. Beloukhova M.I., Lukashov A.N., Volchkov P.Y., Zamyatnin A.A., Deviatkin A.A. Robust AAV Genotyping Based on Genetic Distances in Rep Gene That Are Maintained by Ubiquitous Recombination// DOI: 10.3390/v14051038

Изучение эволюции систем рестрикции-модификации с эндонуклеазой рестрикции семейства AlwI

О.Л. Макарикова^{1,2}, А.В. Алексеевский^{2,3}

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

² НИИ ФХБ им. Белозерского, Москва

³ НИИСИ РАН, Москва

Введение: Система рестрикции-модификации (Р-М) представляет собой систему защиты прокариот от чужеродной ДНК. Она обладает двумя ферментами: эндонуклеазой рестрикции (ЭР) и метилтрансферазой (МТаз). ЭР систем типа II, принадлежащие семейству AlwI и представленные в Pfam доменом RE_AlwI, перспективны для использования в молекулярной биологии в качестве ников [1]. Целью данной работы является изучение эволюции систем Р-М, содержащих белки этого семейства. Для изучения эволюции классов систем Р-М за основу классификации берется набор каталитических доменов ферментов этих систем.

Материалы и методы: НММ-профиль RE_AlwI из базы данных Pfam был размечен в соответствии со структурными доменами ников N.BspDI данного семейства [1] (pdb 2EWF) путем сопоставления ее последовательности с профилем. НММ-профиль cat_AlwI, описывающий каталитический домен ЭР, был создан с использованием программы HMMER3 на основе проверенной и избыточной выборки 87 последовательностей каталитического домена ЭР семейства AlwI из REBASE.

НММ-профили RE_AlwI и cat_AlwI были сравнены путем поиска всех белков из 1089 полных протеомов прокариот из базы данных Uniprot, содержащих хотя бы один белок с доменом RE_AlwI.

Для наиболее представленного класса с одной ЭР и двумя МТазами семейства MethyltransfD12 из Pfam получены координаты генов белков ЭР, обнаруженных по профилю cat_AlwI в указанных выше 1089 протеомах, и МТаз, обнаруженных в тех же 1089 протеомах по профилю MethyltransfD12. Последовательности, расположенные в одном локусе и наиболее вероятно связанные с одной и той же системой Р-М отобраны для построения филогенетических деревьев.

Для класса с одним доменом MethyltransfD12, который оказался на 3 месте по распространенности, так же были найдены последовательности ЭР и МТаз систем и построены их филогенетические деревья. Путем сравнения ветвей деревьев ЭР и МТаз были выявлены предполагаемые события горизонтального переноса генов между системами как число несовпадающих ветвей.

Для поиска новых ников брались известные последовательности ЭР и биохимически подтвержденных ников семейства AlwI из REBASE.

Результаты: Профиль домена RE_AlwI покрывает лишь небольшую часть каталитического домена ЭР. Поэтому мы построили новый профиль cat_AlwI. Оказалось, что 84 последовательности из 1089 полных протеомов прокариот, содержащих домен RE_AlwI, но не домен cat_AlwI, обнаруживаются по профилю RE_AlwI за счет сходства ДНК-связывающего и линкерного доменов, а не каталитического. Значит, профиль cat_AlwI лучше представляет семейство AlwI в рамках нашей задачи, и он был использован для дальнейших исследований.

Системы Р-М, имеющие ЭР с доменом cat_AlwI, составляют 23 класса, а соответствующие МТазы принадлежат к нескольким различным семействам. Наиболее представленным оказался класс с одной ЭР и двумя МТазами семейства MethyltransfD12.

Для этого класса систем Р-М оказалось, что филогенетическое дерево из 154 МТаз делится на две клады одинакового размера, так что одна МТаз принадлежит к одной кладе, а вторая из той же системы к другой. Эти удивительные различия в последовательностях МТаз могут быть связаны с непалиндромными сайтами узнавания, что требует дальнейшего изучения.

Для еще одного распространенного класса систем с одним доменом MethyltransfD12 была изучена эволюция белков ЭР и МТаз 40 систем. Сравнением деревьев МТаз и ЭР было выявлено 12 предполагаемых событий горизонтального переноса.

Большой интерес для молекулярной биологии представляет поиск новых ников среди ЭР данного семейства. Для этого были построены деревья белков ЭР трех самых распространенных классов и известных в этом семействе ников. Наиболее близкие на филогенетическом дереве к никовым белки отмечались как кандидаты на роль потенциальных новых ников.

Выводы: Было показано, что новый профиль, основанный на каталитическом домене никазы N.BspD6I, лучше представляет семейство ЭР AlwI. Результаты, полученные в рамках филогенетического анализа, позволяют предположить, что две МТазы, принадлежащие к одной системе Р-М, претерпевают дивергентную эволюцию. Различия, наблюдаемые в последовательностях МТаз, могли возникнуть в ответ на появление непалиндромных сайтов узнавания. Среди 40 систем Р-М с одним доменом MethyltransfD12 выявлено 12 событий горизонтального переноса. На основе сходства последовательностей ЭР и известных никаз семейства были найдены 2 потенциально новые никазы.

Это исследование поддержано грантом РФФ 21-14-00135.

Литература

1. Zheleznyaya L.A., Kachalova G.S., Artyukh R.I., Yunusova A.K., Perevyazova T.A., Matvienko N.I. Nicking endonucleases// Biochemistry (Moscow), vol. 74, no.13, pp. 1457-1466, 2009, doi:10.1134/S0006297909130033

Система аннотирования абстрактов онкологических медицинских конференций с распознаванием типов сущностей и семантической категоризацией

А.А. Валиев

Boston Gene Technologies

Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

Цель. Создать систему для аннотирования абстрактов медицинских онкологических публикаций с поддержкой предварительной разметки сущностей и классификацией по типам при помощи методов машинного обучения. Система создается для извлечения информации о наличии групп пациентов с определенными заболеваниями и результатов клинических испытаний препаратов из текстов абстрактов конференций, ведущих мировых научных медицинских организаций в области онкологии (AACR, ASCO, ESMO, ASH).

Система Abstract Annotations (система аннотирования абстрактов) входит в проект Knowledge Base компании BostonGene. Целью существования проекта является сбор и подготовка данных для создания персонального отчета пациента, который будет использоваться для помощи в принятии врачебного решения.

Материалы и методы. Для создания системы были использованы следующие программные средства:

Backend: Python (Flask, SQLAlchemy), PostgreSQL, Docker, Kubernetes

Frontend: Typescript (NodeJS, React)

ML: PyTorch (предобученный BERT в качестве модели)

Мотивацией к созданию упомянутой системы является необходимость быстро обрабатывать большие объемы текстов абстрактов конференций и выделять из них структурированные сущности (группы испытуемых с параметрами: количество пациентов, их диагнозы, примененные методы лечения, молекулярные особенности, исходы лечения).

Основной сложностью в обработке неструктурированных текстов с помощью одних лишь методов машинного обучения является крайне низкая выходная точность, и вместе с тем большое количество размеченных данных, требуемое для обучения моделей.

Новизна в создании описываемой платформы состоит в двухэтапном подходе к обработке текстов: совмещение применения методов машинного обучения (ML-методов) для предварительного поиска семантических сущностей в тексте абстракта и затем аннотирование текста человеком. Предварительный поиск сущностей с помощью ML-методов служит для увеличения эффективности работы аннотатора (человек быстрее находит в тексте сущности, подсвеченные с использованием цветовой кодировки по типам сущностей) и сокращения количества ошибок.

Для предварительного отбора перспективных текстов абстрактов была создана система фильтров – поиск абстрактов, содержащих идентификаторы клинических испытаний, определенные типы сущностей, исходы лечения и др. «рис. 1».

Кроме того, отдельной задачей было создание достаточно удобного интерфейса рабочего места аннотатора «рис. 2» (отображение метаданных тестового абстракта, текстового поля с подсвеченными сущностями, аннотационной формы, поддерживающей базовые возможности проверки правильности заполнения, и загрузкой данных из внешних словарей терапий и диагнозов).

Для тестирования системы из доступных текстов абстрактов (18500 штук) были отобраны “перспективные” – где предварительно обнаружены идентификатор испытания, исходы лечения, диагнозы и терапии – в количестве 930.

Результаты. В качестве первых результатов тестового применения системы можно отметить среднее время аннотирования одного перспективного абстракта, составившее 9,6 минут, а также успешную обработку избранных данных крупных онкологических конференций разных лет (AACR 2021, ASCO 2021, ESMO 2021, ASH 2020, ASH 2021) за примерно месяц тестирования (16.06.2022 - 18.07.2022) усилиями четырех аннотаторов. За следующий этап работы системы была проаннотирована конференция ESMO 2022 и подготовлены к работе ASH2022 и SABCS 2022.

Выводы. Тестовое применение системы аннотирования показало достаточную эффективность нового подхода к обработке абстрактов онкологических конференций, вместе с тем выявив ряд нюансов, требующих доработки - например, функции автоматического поиска внешних идентификаторов публикаций (DOI) или проверки качества аннотирования групп испытуемых.

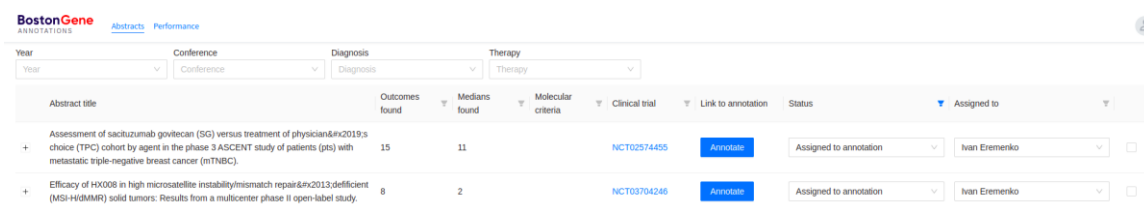


Рисунок 1. Интерфейс фильтрации абстрактов и назначения в аннотирование

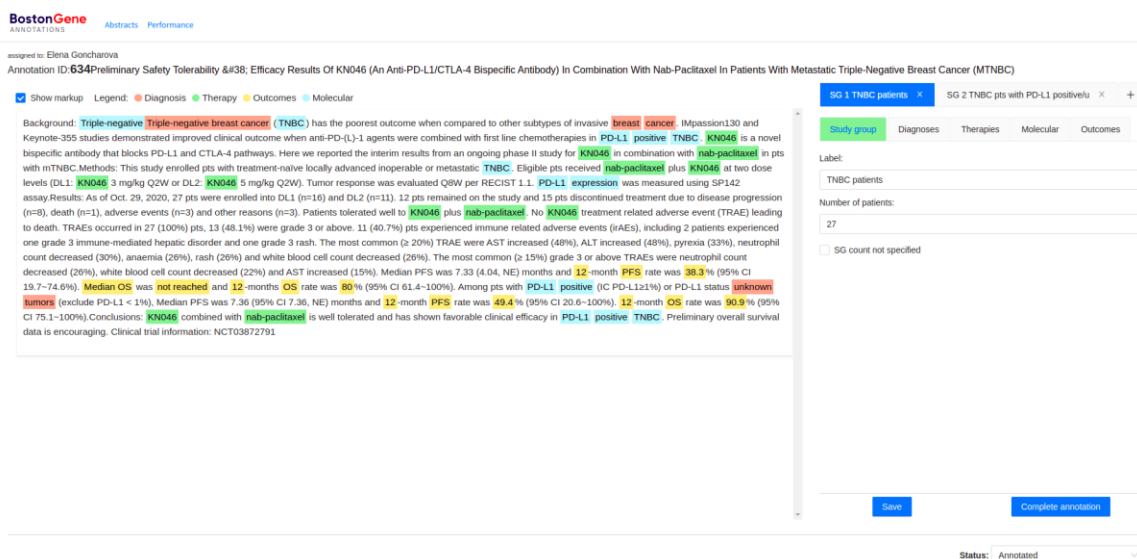


Рисунок 2. Интерфейс рабочего места аннотатора, текстовое поле с подсветкой сущностей разных типов

Литература

1. *Gonçalves S., Cortez P., Moro S.* A deep learning classifier for sentence classification in biomedical and computer science abstracts //Neural Computing and Applications. – 2020. – Т. 32. – С. 6793-6807.
2. *Lee J. et al.* BioBERT: a pre-trained biomedical language representation model for biomedical text mining //Bioinformatics. – 2020. – Т. 36. – №. 4. – С. 1234-1240.
3. *Devlin J. et al.* Bert: Pre-training of deep bidirectional transformers for language understanding //arXiv preprint arXiv:1810.04805. – 2018.
4. *Jin D., Szolovits P.* Hierarchical neural networks for sequential sentence classification in medical scientific abstracts //arXiv preprint arXiv:1808.06161. – 2018.
5. *Bertin M., Atanassova I.* (2014). Hybrid Approach for the Semantic Processing of Scientific Papers. <http://2014.eswc-conferences.org/program/semwebeval.html>, May 2014, Anissaras, Crete, Greece.

Построение шкал генетического риска для фенотипов липидного профиля среди представителей российской популяции

М. Зайченко¹, А.А. Жарикова^{2,3}, Ю.В. Вяткин^{2,4}, А.В. Киселева², А.И. Ершова², Е.А. Сотникова², В.Е. Раменский^{2,3}, А.Н. Мешков²

¹Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет)

²ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России

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

⁴Новосибирский государственный университет

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности на территории Российской Федерации. Атеросклероз и связанные с ним количественные фенотипы липидного профиля -- уровни липопротеинов низкой (ЛПНП) и высокой плотности (ЛПВП), уровень триглицеридов (ТГ) и уровень общего холестерина (ОХ) -- приводят к ишемической болезни сердца, инфаркту миокарда и ишемическому инсульту. Целью данной работы был поиск вариантов, ассоциированных в российской популяции с фенотипами липидного профиля, и построение на их основе шкал генетического риска (ШГР).

Поиск ассоциаций проводился на основе данных секвенирования 1675 жителей города Иваново и области [1]. Для секвенирования использовалась панель, состоящая из 242 клинически значимых генов, ассоциированных преимущественно с сердечно-сосудистыми заболеваниями и соответствующими фенотипами, а также из отдельных вариантов генома, входящих в описанные ранее в литературе ШГР. Данные были обработаны в 38 сборке генома человека с использованием GATK3.8, следуя рекомендациям Broad Institute по определению и фильтрации вариантов генома. Образцы были разделены в соотношении 4:1 для независимого построения GWAS (полногеномного ассоциативного исследования) на большей части выборки и валидации построенной ШГР на меньшей части. Для проведения GWAS использовался пакет hail 0.2.105 [2]. Построение ШГР производилось с помощью пакета PRSice-2 [3].

Проведенное исследование GWAS подтвердило ряд уже известных ассоциаций вариантов с фенотипами: например, в гене APOE три варианта (rs72654473, rs445925, rs7412) ассоциированы с уровнем ЛПНП. Варианты rs445925 и rs7412 ранее были описаны ассоциации с уровнем липопротеинов низкой плотности, для варианта rs72654473 также известна ассоциация с уровнем общего холестерина. Для ЛПВП была показана новая ассоциация с вариантами в некодирующих участках генов RFTN1 и CETP. Аналогичным образом была показана ассоциация некодирующих вариантов в генах ZPR1 и APOA5 с уровнем триглицеридов. Наконец, была показана ассоциация варианта rs7412 в гене APOE с уровнем общего холестерина.

На основе результатов GWAS были построены ШГР для фенотипов липидного профиля. В данном случае для поиска наилучшей ШГР применялся метод "clump and threshold", при котором варианты отбираются по p-value из исследования GWAS, а затем фильтруются по сцепленности с выбором наиболее значимого варианта из сцепленной группы. Наилучшая ШГР для ЛПНП (p-value = $2 \cdot 10^{-4}$) включает 10 вариантов и объясняет 7% вариативности уровней ЛПНП. Наилучшая ШГР для ЛПВП (p-value = $1 \cdot 10^{-4}$) включает 12 вариантов и объясняет 5% вариативности уровней ЛПНП.

Была проведена репликация результатов GWAS из статьи [4], в которой на основе 66329 последовательностей полных геномов была описана статистически значимая ассоциация 1308 вариантов с четырьмя фенотипами: ЛПНП, ЛПВП, ТГ, ОХ. В нашей выборке было найдено 132 варианта из числа описанных в статье, для них в общей сложности было описано 200 ассоциаций со всеми 4 фенотипами липидного профиля. Для каждого фенотипа в нашей выборке ассоциация статистически значимо подтверждается примерно для половины вариантов. На основе оценки силы эффекта вариантов из статьи также были рассчитаны ШГР, которые объясняют от 3% до 5% вариативности количественных фенотипов липидного профиля.

Литература

1. *Ramensky V.E., Ershova A.I., Zaichenoka M. et al.* Targeted sequencing of 242 clinically important genes in the Russian population from the Ivanovo region //Frontiers in genetics. – 2021. – Т. 12. – С. 709419.
2. *Team Hail.* — <https://github.com/hail-is/hail/commit/b3151b4c4271>
3. *Choi S.W., O'Reilly P.F.* PRSice-2: Polygenic Risk Score software for biobank-scale data //Gigascience. – 2019. – Т. 8. – №. 7. – С. giz082.
4. *Selvaraj M.S., Li X., Li Z. et al.* Whole genome sequence analysis of blood lipid levels in > 66,000 individuals //Nature communications. – 2022. – Т. 13. – №. 1. – С. 5995.

Филогенетический анализ эндогенных ретровирусов человека семейств **HERV-K HML-3** и **HML-5**

А.А. Спальвис¹, А.А. Макашов²

¹ГБОУ гимназия №406

²ЧНОУ “Биомедцентр”

Разные авторы группируют эндогенные ретровирусы человека в разное число семейств: от 26 [1] до 50 [2,3], или даже до 350 [4]. Самым молодым семейством эндогенных ретровирусов человека на сегодняшний день является семейство **HERV-K**, в котором есть представители, специфичные только для человека, то есть интегрировавшиеся в геномы его эволюционных предков уже после расхождения родов *Pan* и *Homo* [5,6]. Возраст наиболее древних представителей этого семейства может достигать 40 миллионов лет. Семейство **HERV-K** включает в себя 10 подсемейств – **HML 1-10**. Подсемейство **HML-2** является самым активным, эволюционно-молодым и наиболее изученным среди всех подтипов семейства **HERV-K**.

Эндогенные ретровирусы могут быть использованы как мишени для стимуляции противоопухолевого иммунитета, например, белковый продукт **HERV-K-MEL**, экспрессирующийся в клетках меланомы и многих других опухолей, несет эпитоп, распознаваемый цитотоксическими Т-лимфоцитами у пациентов с меланомой.

Одними из эволюционно старых и экспрессионно малоактивных семейств эндогенных ретровирусов человека могут служить представители подсемейств **HERV-K HML-3** и **HML-5**, чей возраст оценивается, как 35 и 55 миллионов лет соответственно. При этом внутри этих подсемейств отсутствуют человеко- и приматоспецифичные представители. Одновременно с этим представители этих подсемейств относительно плохо изучены, как с точки зрения их эволюции, так и с точки зрения экспрессии в разных тканях человека.

При анализе данных, полученных из базы **HERVd** было обнаружено 498 последовательностей **HERV-K HML-3** и 739 последовательностей **HERV-K HML-5**. При поиске в них генов *pol*, *gag* и *env* было показано, что ген *pol* демонстрирует наилучшую сохранность для обоих подсемейств, в то время как гены *gag* и *env* статистически значимо не обнаруживаются в последовательностях эндогенных ретровирусов этих семейств, что может свидетельствовать о накоплении в них значительного количества мутаций. Так, было обнаружено 255 последовательностей гена *pol* в **HERV-K HML-3**, из которых только 107 соответствовали критерию в 50% покрытия. Для **HERV-K HML-5** было обнаружено 137 последовательностей гена *pol*, из которых 61 соответствовала критерию в 50% покрытия. Ни одна из обнаруженных последовательностей не содержит полноценную открытую рамку считывания.

Обнаруженные последовательности гена *pol* **HERV-K HML-3** были прокластеризованы по степени схожести (рис. 1). Для анализа были взяты только наиболее сохранившиеся последовательности, так как для обработки большого объема данных требовалось слишком много вычислительных ресурсов. Видно, что последовательности группируются в два крупных кластера, хотя в целом различия между ними статистически не всегда достоверны, о чём говорят низкие значения поддержки ветвей.

Таким образом, мы показали, что представители подсемейств **HERV-K HML-3** и **HML-5** сохранили в основном ген *pol*, который, тем не менее, также накопил значительное количество мутаций. Кластеризация обнаруженных генов на данный момент не дала значимых результатов и требует дальнейших работ.

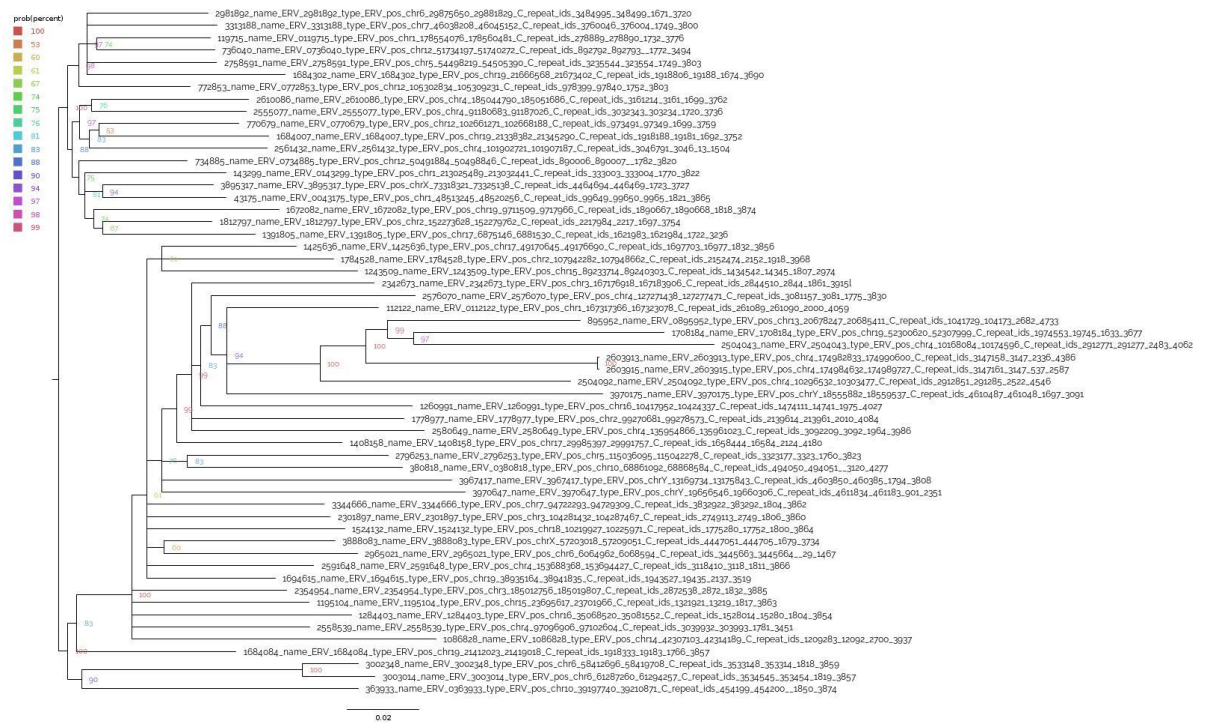


Рисунок 1. Филогенетическое дерево генов *pol* HERV-K HML-3.

Литература

1. Gifford R., Tristem M. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes*. 2003 May; 26(3):291-315. doi: 10.1023/a:1024455415443. PMID: 12876457.
2. Mayer F., Scharhag-Rosenberger F., Carlsohn A., Cassel M., Müller S., Scharhag J. The intensity and effects of strength training in the elderly. *Dtsch Arztebl Int*. 2011 May; 108(21):359-64. doi: 10.3238/arztebl.2011.0359. Epub 2011 May 27. PMID: 21691559; PMCID: PMC3117172.
3. Magiorkinis G., Blanco-Melo D., Belshaw R. The decline of human endogenous retroviruses: extinction and survival. *Retrovirology*. 2015 Feb 2; 12:8. doi: 10.1186/s12977-015-0136-x. PMID: 25640971; PMCID: PMC4335370.
4. Paces J., Pavlicek A., Zika R., Kapitonov V.V., Jurka J., Paces V. HERVd: the Human Endogenous RetroViruses Database: update *Nucl. Acids. Res*. 2004 32: D50
5. Medstrand P., Mager D.L. Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family. *J Virol*. 1998 Dec; 72(12):9782-7. doi: 10.1128/JVI.72.12.9782-9787.1998. PMID: 9811713; PMCID: PMC110489.
6. Garazha A., Suntsova M., Buzdin A. (2016). Structural and Functional Coevolution of Human Endogenous Retroviruses with Our Genome. In: Korogodina, V., Mothersill, C., Inge-Vechtomov, S., Seymour, C. (eds) *Genetics, Evolution and Radiation*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48838-7_38

Перепрофилирование лекарственных средств при помощи графовых нейронных сетей

А.А. Недорубова, К.В. Балакин

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

При разработке новых лекарственных средств существенная доля времени и ресурсов тратится на доказательство безопасности исследуемого препарата. Эта проблема решается при помощи перепрофилирования лекарственных средств, при котором поиск лекарств для лечения тех или иных болезней осуществляется среди уже существующих препаратов с доказанной безопасностью. Существует разные подходы к перепрофилированию лекарств [1]; в настоящей работе для этих целей используются методы машинного обучения.

Основная цель настоящей работы – научиться прогнозировать новые связи между лекарствами и мишенями на основе информации об уже имеющихся связях данного типа. Для достижения поставленной цели в работе используется графовая нейронная сеть – структура, способная учитывать информацию не только о рассматриваемом в данный момент объекте, но и о его ближайшем окружении [2]. Данные для обучения представлены в виде графа, узлы которого соответствуют мишеням (targets) и лекарствам (drugs), а рёбра – наличию связей между ними (рис. 1).

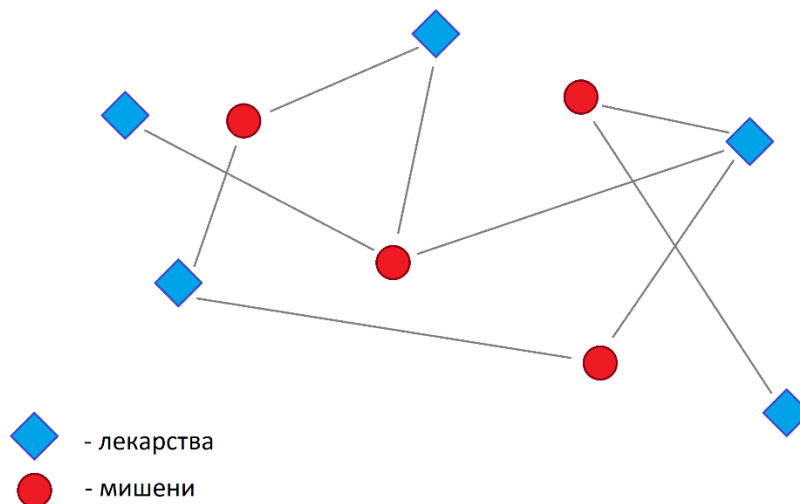


Рисунок 1. Структура данных

В настоящей работе используется нейронная сеть *Decagon*, описанная в работе [3]. Для обучения модели собирался датасет на основе нескольких уже существующих датасетов: *DrugBank*, *CTD*, *Sider*. Каждый элемент датасета состоит из индекса лекарства, индекса мишени и флага наличия взаимодействия между ними (0 или 1). Обучающая выборка является взвешенной, то есть она состоит из равного числа положительных и отрицательных примеров. В процессе обучения модели учитываются не только признаки рассматриваемого узла, но и признаки его ближайшего окружения. После того как модель обучена и валидирована, может быть выполнен прогноз для всех отрицательных связей, то есть на вход модели подаются все элементы датасета с флагом наличия взаимодействия 0. Для каждого элемента датасета модель предсказывает вероятность наличия взаимодействия (действительное число от 0 до 1), после чего элементы сортируются в порядке убывания вероятности наличия взаимодействия.

В таблице 1 приведены примеры предсказаний, проведенных на тестовой выборке. Так, для лекарственного средства госсипол наша программа прогнозирует активность в отношении митохондриальной фосфоенолпируваткарбоксициказы-2 с вероятностью 0,9820. Учитывая истинный флаг наличия связи между рассматриваемыми белком и лекарством (1) и минимальное отклонение предсказанного значения от истинного флага (0,0180), можно сделать вывод о высокой точности прогноза.

Protein (GeneID/ DrugBan)	Protein	Drug	Label	Prediction	Deviation
5106	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, mitochondrial	gossypol acetic acid	1	0,9820	0,0180
4810	NHS actin remodeling regulator	4-(5-benzo(1,3)dioxol-5-yl-4-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)benzamide	1	0,9888	0,0112
57103	TP53 induced glycolysis regulatory phosphatase	Methyl Methanesulfonate	1	0,9967	0,0033

Таблица 1. Примеры предсказаний на тестовой выборке.

В целом разработанная модель с достаточной точностью предсказывает наличие связи между лекарствами и мишенями, в том числе для некоторых пар лекарство-мишень, которые не использовались в обучающей модели. Таким образом, модель может быть применена для поиска «кандидатов на перепрофилирование», то есть для предсказания того, какое лекарство может быть способно воздействовать на заданную мишень, с последующей проверкой предположения в экспериментальных условиях.

Литература

1. Максимов А.С., Дергачёва Ж.М. Стратегия перепрофилирования в поиске новых лекарственных средств// Вестник фармации. 2020. №4 (90). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/strategiya-pereprofilirovaniya-v-poiske-novyh-lekarstvennyh-sredstv>
2. Scarselli F., Gori M., Tsoi A.C., Hagenbuchner M., Monfardini G. The Graph Neural Network Model, in IEEE Transactions on Neural Networks, vol. 20, no. 1, pp. 61-80, Jan. 2009, doi: 10.1109/TNN.2008.2005605.
3. Zitnik M., Agrawal M., Leskovec J. Modeling polypharmacy side effects with graph convolutional networks //Bioinformatics. – 2018. – Т. 34. – №. 13. – С. i457-i466.

Метагеномная сигнатура генов лекарственной устойчивости у пациентов с депрессией

П.А. Кузьмиченко^{1,2}, А.С.Ковтун²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Большое депрессивное расстройство (БДР) является одним из наиболее распространенных психических заболеваний в мире. На сегодняшний день известно, что факторы, вызывающие патогенез БДР, включают микробиоту кишечника (МК), которая взаимодействует с хозяином через ось кишечник-мозг [1]. МК содержит тысячи видов бактерий и является резервуаром генов лекарственной устойчивости к антибиотикам (ГЛУ), называемых резистомом. МК в норме представляет собой стабильное, разнообразное сообщество, которое обеспечивает хозяину важные преимущества, такие как получение питательных веществ и защита от патогенов. Антибиотики могут нарушить эту экосистему, изменив ее таксономический и функциональный состав, создав возможности для колонизации патогенами. В то же время, приобретение лекарственной устойчивости патогенами приводит к потере эффективности существующих препаратов и является серьезной проблемой современной медицины. Это делает изучение резистома МК особенно важным. Целью исследования является анализ распределения ГЛУ в МК пациентов с депрессией и здоровых людей из московского региона.

Сначала мы собрали каталог ГЛУ на основе баз данных CARD, NCBI и MEGARES путем их объединения и дополнения недостающей информации. В полученном каталоге каждой последовательности поставлены в соответствие следующие данные: названия ГЛУ, антибиотика и бактерии, из которой происходит последовательность. Следующим этапом стала разработка биоинформационного вычислительного конвейера для поиска ГЛУ в метагеномных данных. Алгоритм его работы включает аннотацию открытых рамок считывания в метагеноме с использованием каталога ГЛУ и программы BLAST, фильтрацию выравниваний по качеству и оценку относительной представленности с помощью программ BWA MEM и samtools. Полученные показатели представленности ГЛУ были нормализованы с использованием метода Trimmed Mean of M-values, реализованного в пакете edgeR. Относительное содержание генов сравнивали между двумя группами с использованием U-критерия Манна-Уитни с порогом значимости $p < 0,05$ и поправкой FDR для множественных сравнений с использованием метода Бенджамини-Хохберга. Гены, идентифицированные менее чем в половине образцов, были исключены из анализа.

При помощи разработанного метода были проанализированы метагеномы 36 пациентов с БДР и 38 здоровых добровольцев из московского региона. Сравнение представленности ГЛУ к антибиотикам в МК пациентов с депрессией и здоровых добровольцев не показало статистически значимых различий (Рисунок 1). Тем не менее наблюдается большее разнообразие ГЛУ к определенным антибиотикам у пациентов с БДР. Основываясь на полученных данных, можно представить общую характеристику резистома МК взрослого человека из московского региона. В большом количестве образцов (в обеих группах) мы наблюдаем ГЛУ к таким антибиотикам, как тетрациклин, макролид-линкозамид-стрептограмин (МЛС), аминокумарин, аминогликозиды, бета-лактамы антибиотиков. Также с использованием каталога были получены метагеномные сигнатуры на уровне «Род» (Рисунок 2). Поскольку многие ГЛУ располагаются на мобильных элементах, таксономическая принадлежность в сигнатуре описывает, из каких бактерий в МК перенеслись ГЛУ к соответствующим антибиотикам. Наибольшее увеличение пар сигнатур (aminoglycosides; *Campylobacter*), (macrolide; *Streptomyces*), (lincosamide; *Streptomyces*), (streptogramine; *Streptomyces*), а также (beta-lactam, *mixed*) наблюдается у пациентов с депрессией.

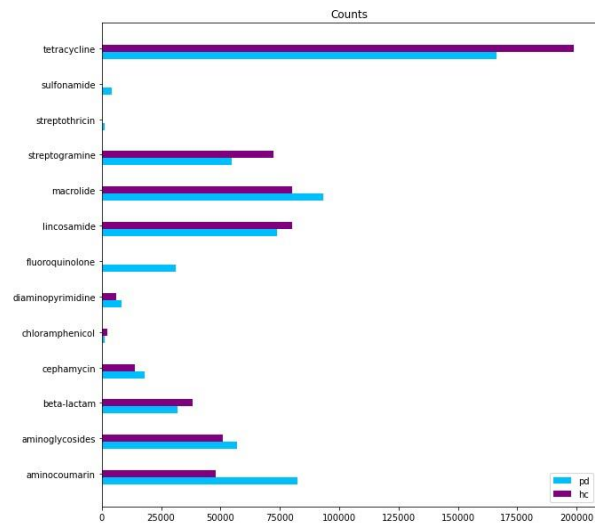


Рисунок 1. Изменения содержания ГЛЮ к антибиотикам в группах PwD и HC. На графике показаны только антибиотики, гены устойчивости к которым идентифицированы более чем в половине образцов.

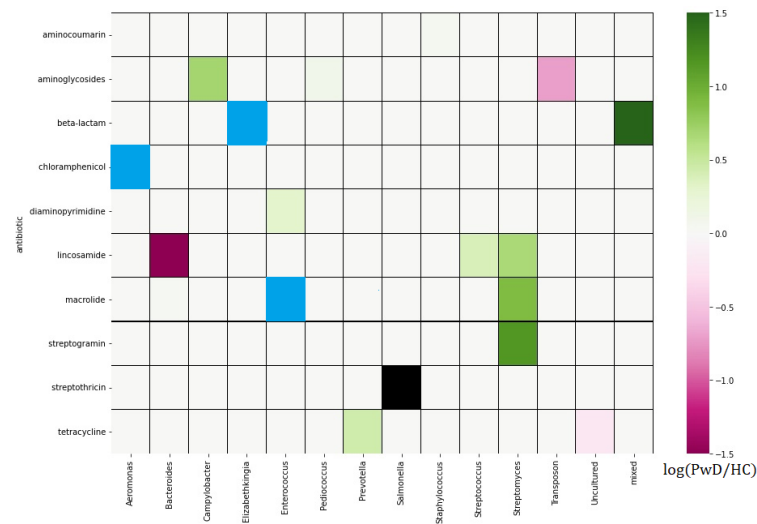


Рисунок 2. Метагеномные сигнатуры, описывающие изменения в GM пациентов с БДР на таксономическом уровне «Род». Представлены только сигнатурные пары, обнаруженные более чем в 50% образцов. Градиент цвета соответствует значению логарифма отношений медианной представленности сигнатурных пар в группах PwD и HC. Градиент зеленого цвета описывает увеличение представленности пар сигнатур, а розовый цвет – уменьшение. Значения «NC» (окрашены черным) представляют собой неисчисляемые отношения, где медиана представленности в группе HC была равна 0. Синий цвет представляет отношения, где медиана представленности в группе PwD была равна 0 (логарифм не определен).

Литература

1. Kovtun AS; Averina OV; Angelova IY; Yunes RA; Zorkina YA; Morozova AY; Pavlichenko AV; Syunyakov TS; Karpenko OA; Kostyuk GP; Danilenko VN Alterations of the Composition and Neurometabolic Profile of Human Gut Microbiota in Major Depressive Disorder // *Biomedicines* 2022, 10, 2162.

Комплексный анализ данных транскриптома и секретома для изучения механизмов изменения фенотипа мезенхимальных стромальных клеток под воздействием опухоли

И.В. Бекбаева¹, К.С. Ануфриева²

¹Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

²ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина
ФМБА России, лаборатория системной биологии

Одним из ключевых компонентов опухолевой стромы являются мезенхимальные стромальные клетки (МСК). Находясь под воздействием опухоли, они могут изменять свой фенотип, превращаясь в опухоль-ассоциированные МСК. Ранее было показано, что МСК способны стимулировать рост, инвазию и метастазирование опухоли, поэтому они являются перспективными мишенями современной противоопухолевой терапии. [1]

В данной работе мы исследовали изменения транскриптома и секретома МСК, возникающих под воздействием опухолевых клеток у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДБККЛ). Результаты анализа данных РНК-секвенирования МСК, полученных как у первичных пациентов с ДБККЛ, так и у пациентов, находящихся в ремиссии, выявили, что под воздействием опухоли МСК приобретают необратимые изменения, которые остаются постоянными даже после десяти лет со дня элиминации опухоли. Согласно нашим данным, в результате такого репрограммирования МСК приобретают провоспалительный фенотип. В ходе работы были также проанализированы данные РНК секвенирования МСК, со-культивированных с секретомом высокоинвазивной клеточной линии рака молочной железы (MDA-MB-231) [2]. Мы выявили сходство паттернов экспрессии МСК пациентов с ДБККЛ с МСК при сокультивации с опухолевым секретомом. Для поиска молекулярного механизма, вызывающего такое репрограммирование МСК, мы проанализированы данные секретома опухолевой клеточной линии MDA-MB-231, а также построили граф белок-белковых взаимодействий на основании базы Reactome и STRING.

По результатам этого анализа мы нашли лиганды FN1 и SERPINE1, способные вызывать необратимые изменения МСК. Оказалось, что под воздействием этих лигандов МСК активируют транскрипционные факторы GATA6 и NPAS2, которые запускают петлю обратной связи, поддерживая провоспалительный фенотип.

Литература

1. Ridge S.M., Sullivan F.J., Glynn S.A. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer*. 2017;16(1):31. Published 2017 Feb 1. doi:10.1186/s12943-017-0597-8
2. Blache U., Horton E.R., Xia T., et al. Mesenchymal stromal cell activation by breast cancer secretomes in bioengineered 3D microenvironments. *Life Sci Alliance*. 2019;2(3):e201900304. Published 2019 Jun 3. doi:10.26508/lsa.201900304

Поиск ингибиторов циклин-зависимой киназы 1, 2 и тирозинкиназы Брутона *in silico* скринингом с проверкой HTS на базе библиотеки молекул ГК «Химрар»

Н.Г. Арутюнян

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Киназы – белки, фосфорилирующие другие белки, что часто активирует или инактивирует их, – достаточно стандартная мишень для противоопухолевой терапии (см. иматиниб и другие).

В частности, циклин-зависимые киназы [1] и тирозинкиназа Брутона (ВТК) [2] проявляют онкогенную активность. К сожалению, ингибиторы 1 (CDK1) и 2 (CDK2) циклин-зависимой киназы низко селективны из-за схожего механизма ингибирования [1], так что особенный интерес вызывает поиск селективных ингибиторов, циклин-зависимых киназ.

Из-за колоссального размера химического пространства, ранний отбор потенциальных ингибиторов производится *in silico*, так как методы виртуального скрининга позволяют дешево и быстро исследовать десятки (и больше, в зависимости от вычислительных мощностей) тысяч молекул.

Я провел виртуальный скрининг библиотеки потенциальных ингибиторов киназ ГК «Химрар» (18350 молекул) open-source бесплатными программами AutoDock Vina [4, 5], smina [6], liggrep [7].

Был проведен докинг (то есть проверено, подходит ли молекула лиганда по трехмерной форме, как ключ, сайту связывания с каждой киназой, как замку; трехмерная структура киназ из кристаллографических файлов из Protein Data Bank, 6gu6 – CDK1, 6inl – CDK2, 6x3p – ВТК), после чего прошедшие молекулы были отфильтрованы на водородные связи с аминокислотами региона hinge каждой киназы (Glu475 – ВТК, Glu81, Leu83 – CDK1, Glu81, Leu83 – CDK2). Из 18350 начальных молекул 80 были отобраны для экспериментальной проверки методами HTS в ГК «Химрар» на всех трех киназах. Активность показала молекула CSPZJGTVAAPONIY-UHFFFAOYSA-N (ID 8013-1695) на ВТК.

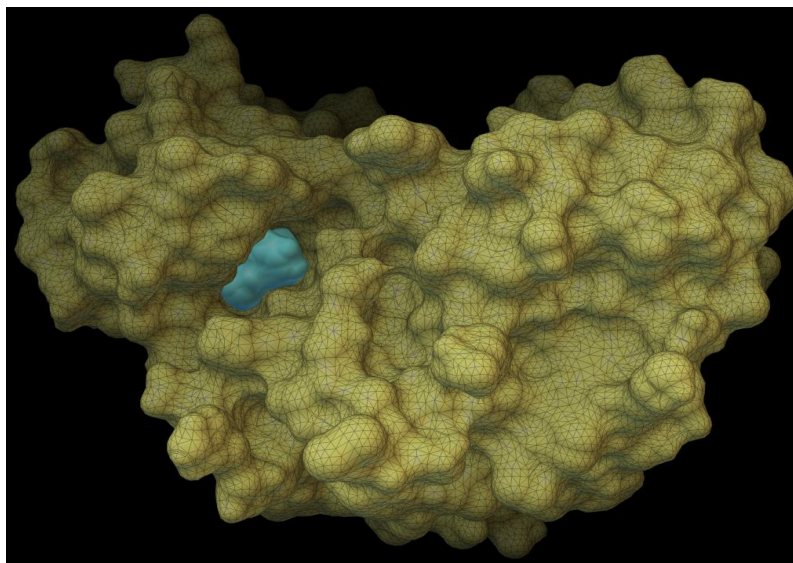


Рисунок 1. Молекула CDK2 (6inl из Protein Data Bank) с потенциальным ингибитором после докинга

Литература

1. Wells C.I., Vasta J.D., Corona C.R. et al. Quantifying CDK inhibitor selectivity in live cells // Nat Commun 11, 2743 (2020)
2. Lahiry P., Torkamani A., Schork N. et al. Kinase mutations in human disease: interpreting genotype phenotype relationships // Nat Rev Genet 11, 60–74 (2010)
3. Forli S., Huey R., Pique M. et al. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite // Nat Protoc 11, 905–919 (2016)
4. Eberhardt J., Santos-Martins D., Tillack, A.F. Forli S. Auto Dock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings // Journal of Chemical Information and Modeling, 2021
5. Trott O., Olson A.J. Auto Dock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // Journal of computational chemistry, 2010, 31.
6. Koes D.R., Baumgartner M.P., Camacho C.J., Lessons Learned in Empirical Scoring with smina from the CSAR 2011 Benchmarking Exercise // Journal of Chemical Information and Modeling 2013 53 (8), 1893-1904
7. Ha E.J., Lwin C.T., Durrant, J.D. LigGrep: a tool for filtering docked poses to improve virtual-screening hit

УДК 575.112

Исследование происхождения эволюционно молодых сайтов сплайсинга

И.С. Воропаев¹, С.В. Денисов²

¹Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

²Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича РАН

Многие общие закономерности образования новых экзонов в ходе эволюции, а также механизмов их появления хорошо изучены [1]. Однако, более мелкие детали этого процесса остаются малоизученными, а именно эволюция самих сайтов сплайсинга, определяющих границы экзона [2].

В данной работе рассмотрена эволюция сайтов сплайсинга в группе приматов: *Homo sapiens*, *Macaca mulatta*, *Callithrix jacchus*, *Otolemur garnettii* (Расположены в порядке возрастания времени эволюционного расхождения с человеком). По проведённому множественному выравниванию последовательностей этих видов на гены человека, были выделены новые экзоны появившиеся у человека со времени его расхождения с *Otolemur garnettii* (Методом внешней группы). Среди эволюционно молодых экзонов, у 75% и донорный и акцепторный сайты сплайсинга, вероятно, имели транспозонное происхождение. Остальные 25% экзонов образовались в ходе мутаций интронной последовательности гена или в ходе активации ранее неактивных сайтов сплайсинга [3]. Для того чтобы выяснить, появляются ли донорный и акцепторный сайты сплайсинга одновременно в ходе эволюции или эти события разнесены во времени, была построена таблица корреляции между событиями появления донорного и акцепторного сайтов сплайсинга в разные моменты эволюции (рис. 1). По сильной отрицательной корреляции между событиями появления двух этих сайтов, был сделан вывод, что среди экзонов которые образовались в ходе мутаций в интронной последовательности или активации ранее неактивных сайтов сплайсинга, донорные и акцепторные сайты появляются независимо в подавляющем большинстве случаев.

Работа выполнена при поддержке программой РФФИ.

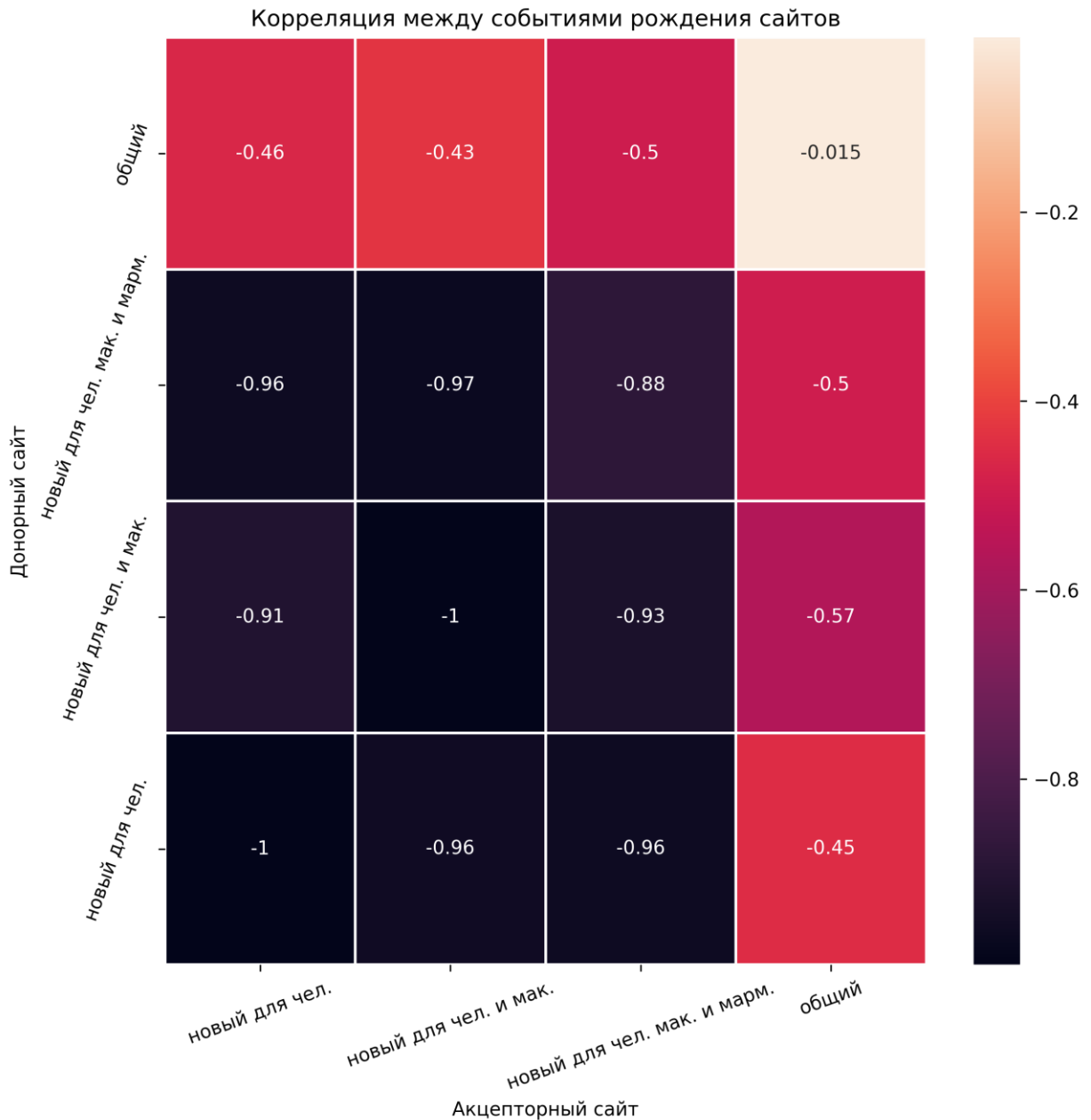


Рисунок 1. Таблица корреляции событий рождения донорных и акцепторных сайтов разного возраста образования

Литература

1. Sorek R. The birth of new exons: Mechanisms and evolutionary consequences. *RNA* (2007). *13*, 1603–1608.
2. Denisov S., Bazykin G., Favorov A., Mironov A., Gelfand M. Correlated Evolution of Nucleotide Positions within Splice Sites in Mammals. *PLoS One*. 2015
3. Kapustin Y., Chan E. Sarkar R., Wong F., Vorechovsky I., Winston R.M., Tatusova T., Dibb N.J. (2011). Cryptic splice sites and split genes. *Nucleic Acids Res* *39*, 5837–5844.

Поиск соматических мутаций, приводящих к появлению энхансеров при онкологических заболеваниях

Я.С. Киселёва¹, Р.И. Султанов², Г.П. Арапиди²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.Н. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности во всём мире [1]. Недавние исследования показывают, что нарушение работы регуляторных элементов генома, энхансеров, из-за точечных мутаций может быть причиной злокачественного перерождения тканей [2]. Как известно, энхансеры регулируют экспрессию генов посредством связывания с транскрипционными факторами. Несмотря на то, что в настоящее время много внимания уделяется изучению нарушений в функционировании энхансеров, лишь в некоторых работах были описаны мутации, приводящие к возникновению *de novo* мотивов связывания транскрипционных факторов. Поэтому целью данной работы стал поиск однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), приводящих к появлению новых сайтов связывания транскрипционных факторов и, как следствие, энхансеров.

В представленной работе мы определили мутации клеточной линии K562, которые потенциально могут приводить к формированию мотивов связывания транскрипционных факторов. Для поиска мутаций мы использовали данные полногеномного секвенирования (WGS) клеточной линии K562 (ENCODE Project) и программу HaplotypeCaller GATK. Мы оценивали изменение вероятности связывания транскрипционного фактора до и после мутации при помощи позиционной весовой матрицы (PWM, содержит информацию о специфичности связывания транскрипционного фактора с тем или иным основанием в той или иной позиции) из базы данных HOCOMOCSO. На примере транскрипционного фактора GATA2 мы нашли 39321 (1.05% от всех) мутаций, которые потенциально могут приводить к появлению сайта связывания. Для того чтобы проверить, какие из этих мутаций действительно привели к связыванию GATA2 с ДНК, мы провели анализ данных иммунопреципитации хроматина на GATA2 (ChIP-seq). Известно, что для мутаций, изменяющих средство последовательности ДНК к транскрипционному фактору, может наблюдаться смещение аллельных частот этой мутации в ChIP-seq экспериментах на соответствующий транскрипционный фактор либо в данных по гиперчувствительности к ДНКазе I (DNase-seq). Было обнаружено 3 мутации, которые приводят к появлению потенциальных сайтов связывания GATA2, имеющих пересечения с пиками ChIP-Seq для GATA2, и имеют повышенное покрытие альтернативной аллели по отношению к референсу в данных экспериментов ChIP-seq на GATA2 и DNase-seq для клеточной линии K562 (ENCODE Project).

Таким образом, в результате нашей работы было показано, что лишь малая часть SNP мутаций приводит к действительному возникновению нового сайта связывания транскрипционного фактора GATA2. С использованием таких инструментов как samtools, bedtools и языка программирования Python был разработан и реализован алгоритм, позволяющий проанализировать влияние SNP мутаций на образование потенциальных сайтов связывания транскрипционного фактора. В дальнейшем мы планируем расширить анализ на транскрипционные факторы, для которых есть данные экспериментов на клеточной линии K562, и определить ассоциации полученных мутаций с онкологическими заболеваниями.

Литература

1. *Sung H. et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. // *CA Cancer J Clin.* 2021. V. 71. P. 209–249.
2. *Herz H.-M., Hu D., Shilatifard A.* Enhancer Malfunction in Cancer // *Mol Cell.* 2014. V. 53. P. 859–866.

Развитие вычислительной системы поиска возможных поллютантов в пресной природной воде

Н.С. Егоров, М.С. Медведев, С.В. Силкин, И.А. Попов

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

В настоящее время разрабатывается вычислительная система для поиска и количественных оценок основных загрязнителей природной воды, таких как тяжелые металлы, АПАВ, органические компоненты и т.п. Классические лабораторные методы анализа качества природных вод [1, 2] довольно трудоемки и требуют временных затрат, что негативно сказывается на скорости мониторинга водных объектов [3]. Это приводит к необходимости разработки полевых экспресс методов анализа качества природной воды. Такие методы требуют от пользователя квалификации в химическом анализе, а также весьма ограничены в наборе измеряемых параметров качества природной воды и не позволяют проводить полный анализ всех ее компонентов. Для расширения набора параметров качества природной воды в рамках полевого экспресс-анализа и для валидации его результатов, исходя из интегральных характеристик качества природной воды, нами предложена разработка вычислительной среды, которая способна выявлять не валидные результаты экспресс-анализа, а также количественно оценивать наличие поллютантов в ней, не прибегая к их непосредственному измерению.

Ранее нами была предложена вычислительная среда для оценивания минерального состава природной воды, однако она не давала информацию об органических компонентах [5]. В данной работе вычислительная среда была расширена на количественные оценки органических компонентов и на поиск возможных минеральных поллютантов. Для реализации поиска органических веществ использовались методы PCA (Principal Component Analysis) и линейной регрессии. Для поиска нахождения возможных минеральных поллютантов было предложено решение системы (1) параметрических уравнений в автоматическом режиме. Это было реализовано в программе Python Limitations. Перебирались возможные наборы концентраций поллютантов и сравнивались экспериментальные значения. Так была сформирована вычислительная система, реализованная на языке программирования Python, а также Google Sheets.

$$\begin{cases} \lambda = \lambda_0 - (A + B \lambda_0) \sqrt{I} \\ \kappa = \sum_{i=1}^n \lambda_i \cdot z_i \cdot c_i \\ \Delta p H_i = \frac{c_i}{\pi_i} \\ PP = [M^{n+}]^m \cdot [An^{m-}]^n \text{ или } PP = [M^{n+}]^m \cdot [OH^{m-}]^n \end{cases}$$

(1) где: λ – эквивалентная электропроводность, A и B – численные коэффициенты, I – ионная сила раствора, κ – удельная электропроводность, z_i и c_i – модуль заряда и концентрация i -го иона, π – буферная емкость раствора, PP – произведение растворимости соли или гидроксида тяжелого металла.

Экспериментальная часть заключалась в приготовлении серий модельных растворов, имитирующих природную воду разной степени загрязненности, и измерении для каждого из них восьми интегральных параметров: температура, рН, удельная электропроводность, мутность (NTU – nephelometric turbidity unit), цветность, растворенный кислород, ОВП – окислительно-восстановительный потенциал и ХПК – химическое потребление кислорода. Приготовление растворов производилось путем добавления определенных количеств солей, обычно содержащихся в природных водах, солей тяжелых металлов, АПАВ в виде SDS (sodium dodecyl sulfate) и органических веществ, представленных торфяными зольями, полученными по методике, описанной в [6]. Нами было предложено приготовление трех принципиально разных серий модельных растворов, имитирующих мало загрязненные, умеренно загрязненные и сильно загрязненные природные воды. К первой серии относились растворы, в которых состав основных компонентов природной воды и введенных поллютантов не превышал ПДК, за исключением SDS. Вторая серия была представлена основными компонентами природной воды и поллютантами, с концентрациями близкими к ПДК, а третья серия – значительно превышающими ПДК. В общей сложности было приготовлено 37 модельных растворов, для каждого из которых определяли интегральные показатели качества воды. Таким образом, была создана база данных соответствия состава воды и ее интегральных характеристик, которые легли в основу PCA анализа и линейной регрессии.

В качестве интегрального параметра оценки загрязнения природных вод органическими веществами использовали ХПК. Величина ХПК, связанная с неорганическими восстановителями вычислялась из следующих соображений:

был выполнен расчет потенциала $E(MnO_4^-/Mn^{2+})$ в условиях определения перманганатной окисляемости по методике, описанной в нормативной документации [7], который оказался равен 1,4 В;

рассчитанный потенциал $E(MnO_4^-/Mn^{2+})$ сравнивали с потенциалами неорганических восстановителей, пересчитанных на данные условия в автоматическом режиме;

в случае, когда потенциал восстановителя оказывается ниже потенциала $E(MnO_4^-/Mn^{2+}) = 1,4$ В, его концентрацию пересчитывали на величину перманганатной окисляемости.

В настоящее время теоретической зависимости между ХПК и остальными интегральными параметрами качества воды неизвестна [1, 2], что приводит к необходимости его определения. Полевая методика определения ХПК является весьма затруднительной, поскольку предполагает горячее перманганатометрическое титрование [4]. Наиболее высокие коэффициенты регрессии наблюдались для

удельной электропроводности, температуры и концентрации торфяного золя (табл. 1). По интегральным параметрам были предсказаны значения ХПК с погрешностью около 10%.

Таблица 1. Основные параметры для линейной регрессии

Параметр	Коэффициент регрессии	Приведенный коэффициент регрессии	Вклад параметра, в % от максимального значения
Удельная электропроводность, мкСм/м	0,019	19,0	100
Температура, °С	1,63	16,3	86
Концентрация торфяного золя, мг/л	0,66	6,6	35
рН	3,0	3,0	16
ОВП, мВ	-0,026	-2,6	14
Концентрация основных компонентов, мМ	-1,2	-1,2	6
Мутность, NTU	-0,011	1,1	6
Цветность, град. цвет-ги	-0,006	-0,6	3

По нашим расчетам ХПК оказывается важным параметром для PCA анализа и его исключение приводит к диссипации точек на диаграмме. Экспресс оценка качества воды по количеству в ней поллютантов проводилась с помощью PCA анализа в 10-мерном пространстве. Для селективности анализа проводили PCA отдельно для торфяного золя, катионов тяжелых металлов и SDS. Проекция точек 10-мерного пространства на плоскость позволила разделить множество на три кластера – области с концентрациями поллютантов ниже, приблизительно равными и выше значений, соответствующих ПДК. Это позволяет отнести исследуемую пробу воды к одной из трех областей и судить об оценочном количестве каждой из групп поллютантов.

Для оценки концентраций катионов тяжелых металлов в природной воде было выбрано три опорных параметра: рН, удельная электропроводность и произведение растворимости (ПР). Оценка сверху количества различных катионов тяжелых металлов проводилась написанной нами программой Python Limitations путем минимизации разницы между расчетными [5], экспериментальными значениями рН и удельной электропроводности. Это позволило установить верхние границы концентраций катионов тяжелых металлов, не прибегая к их непосредственному определению. В результате были получены три диаграммы (рис. 1), иллюстрирующие загрязнение модельных растворов торфяным золем, катионами тяжелых металлов и SDS. Представленные диаграммы 1 (а, б) для первых двух типов поллютантов демонстрируют заметное разделение областей точек, однако, этого не наблюдается для SDS. Как видно из диаграммы 1 (в), точки на диаграмме распределены хаотично, что на данный момент не позволяет определить содержание SDS таким методом в исследуемой пробе воды. Это происходит из-за большого количества процессов, таких как падение поверхностного натяжения, изменение подвижности ионов, мицеллообразование и т.п. [8], и их наложения друг на друга в растворе. Вероятно, расширение базы данных для PCA анализа позволит определять содержание АПАВ в пробах природных вод.

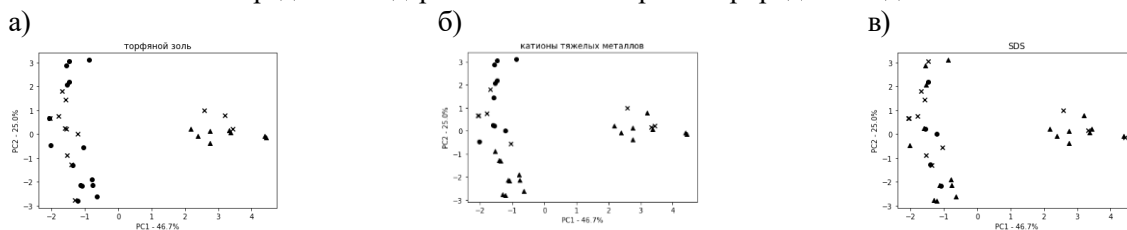


Рисунок 1. Результаты работы PCA. ▲ – растворы с наибольшей степенью загрязнения (>ПДК), ● – растворы с умеренной степенью загрязнения (~ПДК), × – наименее загрязненные растворы (<ПДК).

Наибольший вклад в разделение точек по основной компоненте PC1 вносят следующие параметры качества воды: концентрация основных компонентов, общее железо, удельная электропроводность и цветность (табл. 2). Результаты работы PCA анализа для катионов тяжелых металлов вполне согласуются с

результатами вычислений в программе Python Limitations. Таким образом, один из этих подходов может быть использован для проверки корректности работы другого.

Таблица 2. Вклад параметров в PCA анализ

Параметр	Статистический вес по PC1 (loading scores)
Концентрация основных компонентов, мМ	0,45
Общее железо, мМ	0,45
Удельная электропроводность, мкСм/м	0,45
Цветность, град. цвет-ти	0,41
Мутность, NTU	0,37
Растворенный кислород, мг/л	0,23
ОВП, мВ	-0,15
ХПК, мгО/л	0,10
pH	0,07
Температура, °С	-0,03

Предложенная нами вычислительная система, состоящая из трех модулей: линейная регрессия, PCA анализ и Python Limitations – позволила количественно оценивать наличие поллютантов в модельных растворах, не прибегая к их непосредственному измерению. Результат ее работы дает возможность судить о качестве природной воды, интерпретируя ее интегральные параметры, легко определяемые в полевых условиях. Отдельные результаты вычислительной системы параллельно проверяли с помощью Google Sheets, которая способна выявлять невалидные результаты полевого экспресс-анализа качества природной воды.

Литература

1. Лео М.Л., Лин С.П. Де Гелдер. Анализ воды. Справочник: пер с англ. 2-е изд. под ред И.А. Васильевой, Б.Л. Пролетарской -СПб.: “Профессия”, 2012 - 920 с
2. Резников А.А., Муликовская Е.П. и Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. 3-е изд. - М: “Недра”. 1970. 488с.
3. Arndt J. et al. Making waves: Time for chemical surface water quality monitoring to catch up with its technical potential //Water Research. 2022. V. 213. P. 118-168.
4. Руководство по анализу воды. Питьевая и природная вода, почвенные вытяжки / Под ред. Муравьева. А.Г. - Изд. 4-е, перераб и дополн. - СПб.: “Крисмас +”, 2018. - 360 с.
5. Silkin S.V. et al. Mineral composition modeling of natural surface water //International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 2021. P. 1-12.
6. Силкин С.В., Куликов Е.Е., Попов И.А. Исследование управляемого ультразвукового диспергирования торфа и бурого угля в воде // ТРУДЫ МФТИ. Труды Московского физико-технического института (национального исследовательского университета). 2018. Т. 10, № 3(39). С. 86-95.
7. ПНД Ф 14.1:2:4.154-99. МИ перманганатной окисляемости в пробах питьевых, природных и сточных вод титриметрическим методом.
8. Еремин В.В., Каргов С.И., Успенская И.А. Основы физической химии: учеб. пособие. В 2 ч. Ч.1. Теория. 2013.

Анализ индивидуальных транскриптомов рака печени**И.Н. Калужский¹, В.Ю. Макеев^{1,2}**¹Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)²Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН

Рак печени это шестой самый распространенный рак в мире. Ожидается, что число новых диагностированных случаев рака печени к 2040 вырастет до 1.4 миллиона и количество смертей от него вырастет до 1.3 миллиона [1]. Гепатоцеллюлярная карцинома является самым распространенным первичным раком печени. Факторы риска включают в себя гепатит В и С и цирроз печени [2]. Поиск онкомаркеров является важным направлением для диагностики и лечения рака.

Среди онкомаркеров особый интерес представляют те, которые способствуют выживанию клеток опухоли в организме. В отличие от клеток опухолевых линий в культуре, в организме клетки опухоли выживают в условиях идущих воспалительных реакций и формирующегося иммунного ответа. При достаточном размере опухолей может возникать недостаток кровоснабжения, приводящий к гипоксии и повышенной концентрации токсичных продуктов обмена. В настоящей работе был предпринят поиск генов, активность транскрипции которых была повышена в образце гепатокарциномы, как по сравнению со здоровой тканью печени, так и по сравнению с культивируемыми линиями опухолевых клеток.

В данной работе были выделены онкомаркеры гепатокарциномы на основании результатов секвенирования транскриптомов рака печени и ассоциированной с раком здоровой ткани 25 пациентов. Для выделения маркеров также были использованы транскриптомы клеточных линий рака печени, взятых из открытых источников: HepG2, Hep3B и HUH7. Результаты секвенирования транскриптов клеточных линий, образцов опухоли и ассоциированной с ней ткани были картированы при помощи пакета STAR; число транскриптов (ридкаунты) подсчитывалось при помощи пакета salmon. Образцы были отнормированы на миллион каунтов, гены, имеющие число каунтов больше 1 хотя бы в 20 образцах опухоли и, одновременно, 20 образцах печени были выделены для дальнейшего анализа.

Для кластеризации образцов опухоли на два подтипа были выбраны 1633 гена дифференциально экспрессированных по сравнению со здоровой печенью, имеющие $\log_{2}FC > 0.5$, $pvalue < 0.001$ и среднее $\log_{2}CPM > 5$. Далее были посчитаны коэффициенты корреляции Пирсона между образцами опухоли и была проведена иерархическая кластеризация. Были получены два кластера содержащие 37 и 12 образцов опухоли (19 и 6 пациентов соответственно).

Для анализа дифференциальной экспрессии кластеров были выбраны дифференциально экспрессированные гены: по отношению к клеточным линиям HepG2, Hep3B и HUH7, имеющие $\log_{2}FC > 4$ и $pvalue < 0.001$; из этих генов выделялись дифференциально экспрессированные по отношению к ассоциированной с опухолью нормальной тканью пациентов, имеющие $\log_{2}FC > 2$, $pvalue < 0.01$ и $pvalue < 0.005$ для первого и второго кластеров соответственно (рис.1).

Анализ дифференциальной экспрессии кластеров опухоли по отношению к ассоциированной ткани пациентов и клеточной линии показал, что гены COL4A1, COL15A1, CDH13, CD34 и PLVAP (рис. 1) можно считать специфическими маркерами гепатокарциномы в организме. Четыре из этих генов (PLVAP, CD34, COL4A1, COL15A1) были описаны ранее как потенциальные клинические маркеры гепатокарциномы [3, 4, 5, 6], ген CDH13 был описан как потенциальный клинический маркер рака почки [7] - органа, гистологически достаточно родственного печени.

Анализ KEGG путей дифференциальной экспрессии кластера с меньшим содержанием нормальной ткани показал значимую разницу в экспрессии генов интегринов альфа-3, 4, 8 и 11, анализ экспрессии этих генов подлежит дальнейшему исследованию.

Предполагается, что описанный метод может помочь выявить интересные мишени для комплексной специфической терапии разных видов онкологии.

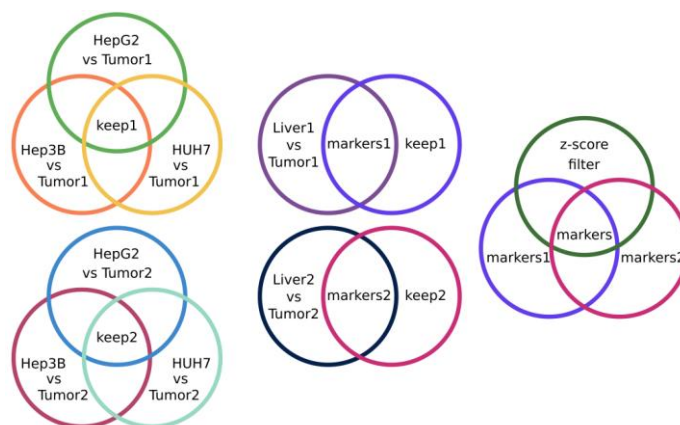


Рисунок 1. Схематичное представление процедуры выбора дифференциально экспрессированных генов.

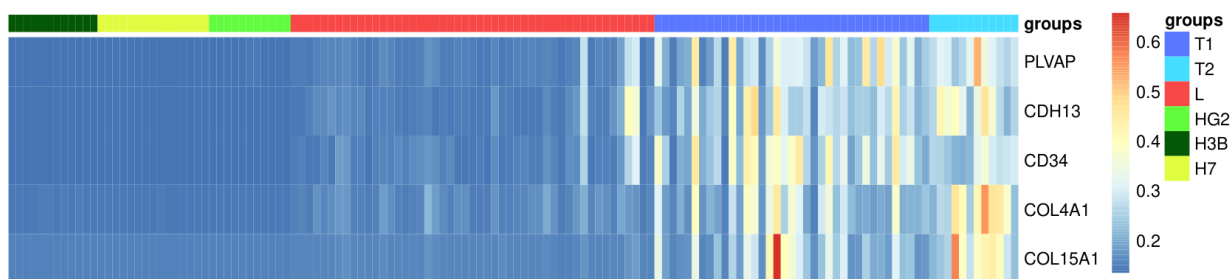


Рисунок 2. Экспрессия выбранных маркеров опухоли (T1 - опухоль первого кластера, T2 - опухоль второго кластера, L - нормальные образцы печени, HG2 - клеточная линия HepG2, H3B - клеточная линия Hep3B, H7 - клеточная линия HUH7).

Литература

1. Rungay H., Arnold M., Ferlay J., Lesi O., Cabasag C.J., Vignat J., et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. // J Hepatol Published online 6 October 2022.
2. Llovet J.M., Kelley R.K. Villanueva A. et al. Hepatocellular carcinoma. // Nat Rev Dis Primers 2021. 7, 6
3. Wang Y.H., Cheng TY., Chen TY. et al. Plasmalemmal Vesicle Associated Protein (PLVAP) as a therapeutic target for treatment of hepatocellular carcinoma. // BMC Cancer 2014. 14, 815 (2014)
4. de Boer W.B., Segal A., Frost F.A., Sterrett G.F. Can CD34 discriminate between benign and malignant hepatocytic lesions in fine-needle aspirates and thin core biopsies? // Cancer. 2000 Oct 25;90(5):273-8.
5. Wang T., Jin H., Hu J. et al. COL4A1 promotes the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells by activating FAK-Src signaling. // J Exp Clin Cancer Res 2020. 39, 148
6. Zhang Z., Li J., He T. et al. Two predictive precision medicine tools for hepatocellular carcinoma. // Cancer Cell Int 2019. 19, 290
7. Shao Y., Li W, Zhang L., Xue B., Chen Y., Zhang Z., Wang D. CDH13 is a prognostic biomarker and a potential therapeutic target for patients with clear cell renal cell carcinoma. // Am J Cancer Res. 2022 Oct 15;12(10):4520-4544.

Функциональная аннотация генома сахарной свёклы методами сравнительной геномики

Л.Е. Скаковская^{1,2}, В.Ю. Макеев^{1,2}, А.С. Касьянов^{1,2}

¹Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

² Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН

Сахарная свёкла — важнейшая культура сельского хозяйства. Она обеспечивает около 30% годового производства сахара в мире, а также является кормом для животных и одним из источников биоэтанола. Россия является крупнейшим производителем сахарной свёклы в мире, однако, практически все семена её закупаются за рубежом. Поэтому становится очевидной важность исследования сахарной свёклы и, в частности, ее функциональной геномики.

В работе была проведена функциональная аннотация референсного генома *Beta vulgaris* [1, 2] двумя способами на основе более полно аннотированных родственников свёклы — *Chenopodium quinoa* [3], *Spinacia oleracea* [4], а также *Arabidopsis thaliana* [5].

В первом способе использовался подход COG (Clusters of Orthologous Genes) [6]. Для каждой пары видов при помощи программы BLAST [7] производилось выравнивание всех генов одного вида на все гены другого вида и наоборот. Далее находились двунаправленные лучшие совпадения (Bidirectional Best Hits, далее ВВН): среди генов двух видов находились такие пары генов, которые являются лучшими выравниваниями друг для друга. Такие ВВН находились для всех пар видов, из чего были построены треугольники, где все гены являются лучшими выравниваниями друг друга, а затем и аналогичные четырехугольники (рис. 1). Если хотя бы один ген из такого четырехугольника или треугольника имеет функциональную аннотацию, её можно перенести на гомологичный ген свёклы в предположении, что гены, похожие по последовательности, имеют схожие или одинаковые функции.

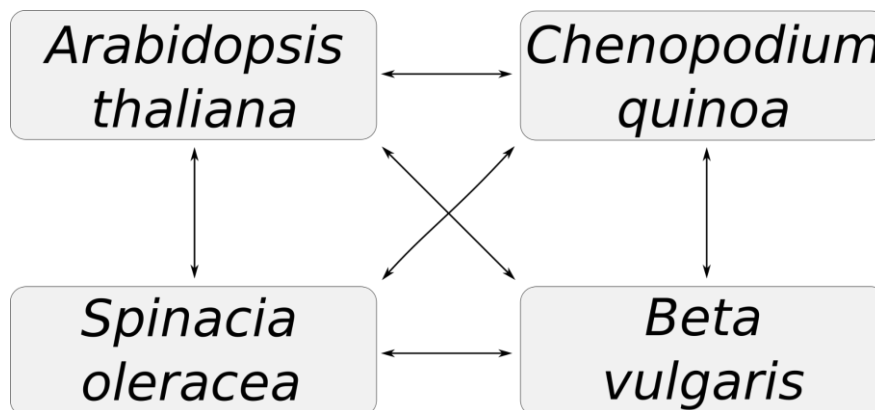


Рисунок 1. Двунаправленные лучшие совпадения для четырех видов

Второй способ аннотации полагается на использование программы OrthoFinder [8], определяющей группы ортологичных генов. На основе данных о принадлежности генов к одной ортогруппе также была перенесена функциональная аннотация с ортологичных генов других видов на гены свёклы:

1. В случае, если в ортогруппе присутствовал один ген свёклы и один ген другого вида, аннотация с него переносилась однозначно
2. В случае, если в ортогруппе присутствовало несколько генов-представителей разных видов, то в ортогруппе производилось выравнивание при помощи BLAST, находились ВВН, и аннотация переносилась с аннотированного самого близкого ортолога.

Аннотация проводилась на двух референсных геномах, часть генов которых уже была аннотирована. В табл.1 представлены данные о количестве генов, которые удалось аннотировать каждым способом.

Таблица 1. Результаты функциональной аннотации референсных геномов Beta Vulgaris

Сборка референсного генома	RefBeet 1.2.2 [1]	BeetEL 10.1 [2]
Всего генов	32874	38090
Аннотировано ранее	19272	23805
Аннотировано нами при помощи BLAST	2978	2409
Аннотировано нами при помощи OrthoFinder	213	239

На рисунке 2 представлено распределение аннотированных нами генов по соответствующим функциям.

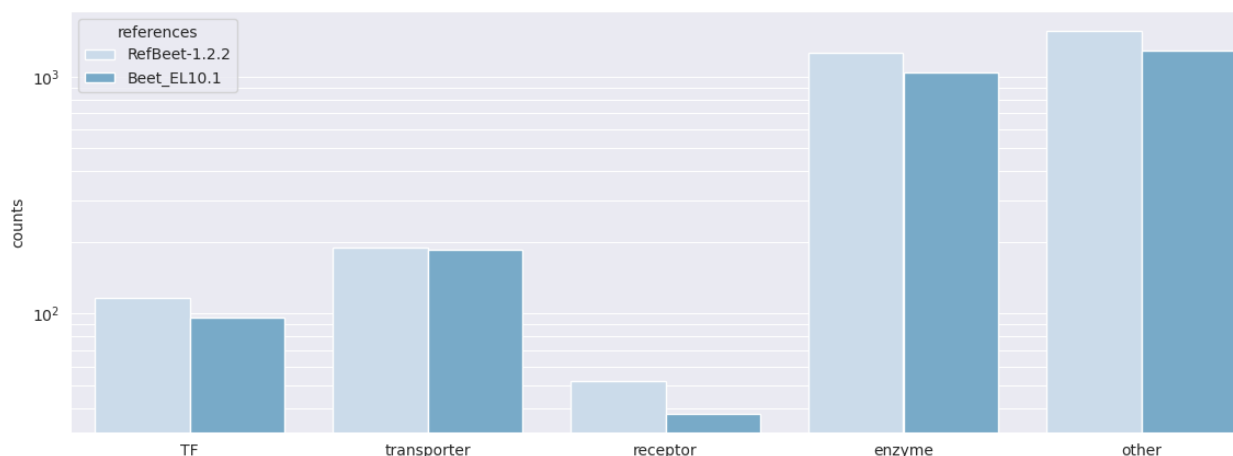


Рисунок 2. Представленность генов с различными функциями

Работа проводилась при поддержке ООО «СоюзСемСвёкла».

Литература

1. *Dohm J.C. et al.* The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*) //Nature. – 2014. – Т. 505. – №. 7484. – С. 546-549.
2. *McGrath J.M. et al.* A contiguous de novo genome assembly of sugar beet EL10 (*Beta vulgaris* L.) //DNA Research. – 2023. – Т. 30. – №. 1. – С. dsac033.
3. *Jarvis D.E. et al.* The genome of *Chenopodium quinoa* //Nature. – 2017. – Т. 542. – №. 7641. – С. 307-312.
4. *Xu C. et al.* Draft genome of spinach and transcriptome diversity of 120 *Spinacia* accessions //Nature Communications. – 2017. – Т. 8. – №. 1. – С. 15275.
5. *Lamesch P. et al.* The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools //Nucleic acids research. – 2012. – Т. 40. – №. D1. – С. D1202-D1210.
6. Galperin M. Y. et al. Microbial genome analysis: the COG approach //Briefings in bioinformatics. – 2019. – Т. 20. – №. 4. – С. 1063-1070.
7. *Altschul S.F. et al.* Basic local alignment search tool //Journal of molecular biology. – 1990. – Т. 215. – №. 3. – С. 403-410.
8. *Emms D.M., Kelly S.* OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics //Genome biology. – 2019. – Т. 20. – С. 1-14.

Молекулярно-генетический мониторинг вирусных возбудителей инфекционных заболеваний с использованием платформы VGARus

Г. В. Роев^{1,2}, К. Ф. Хафизов^{1,2}

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Молекулярно-генетический мониторинг вирусных патогенов является важным научным направлением в современной эпидемиологии. Он необходим для своевременной оценки эпидемиологической ситуации в стране, создания диагностических тестов, а также разработки вакцин.

В соответствии с Постановлением Правительства РФ была создана Российская платформа агрегации данных о геномах вирусов VGARus [1], свидетельство о государственной регистрации №2021621178 от 02.06.2021 г. С ее помощью проводится централизованный сбор данных секвенирования, метаданных образцов, анализ динамики и структуры выявленных вариантов SARS-CoV-2 в РФ. VGARus разработан с использованием современных решений в области информационных технологий и работает на основе микросервисной архитектуры.

Несколько десятков организаций Роспотребнадзора, Минздрава и других ведомств загружают в базу последовательности геномов SARS-CoV-2. Помимо российских организаций в процессе сбора и загрузки данных также были задействованы организации из Республики Беларусь и Республики Армения.

В базу VGARus имеется возможность загрузки как полных геномов SARS-CoV-2, так и фрагментных сиквенсы гена S-белка. У загруженных последовательностей есть большое количество полей метаданных, таких как, например, статус вакцинации пациента, его сопутствующие диагнозы или недавние поездки за границу. Это выгодно отличает VGARus от других баз, где набор метаданных крайне ограничен.

По состоянию на 15 марта 2023 года в базу VGARus загружено всего 144261 полногеномных последовательностей SARS-CoV-2 и 93692 фрагментных (ген S-белка). Для сравнения, в международную базу GISAID [2] загружено 66338 полных геномов из России. Таким образом, VGARus в данный момент является крупнейшим хранилищем геномов SARS-CoV-2 из России.

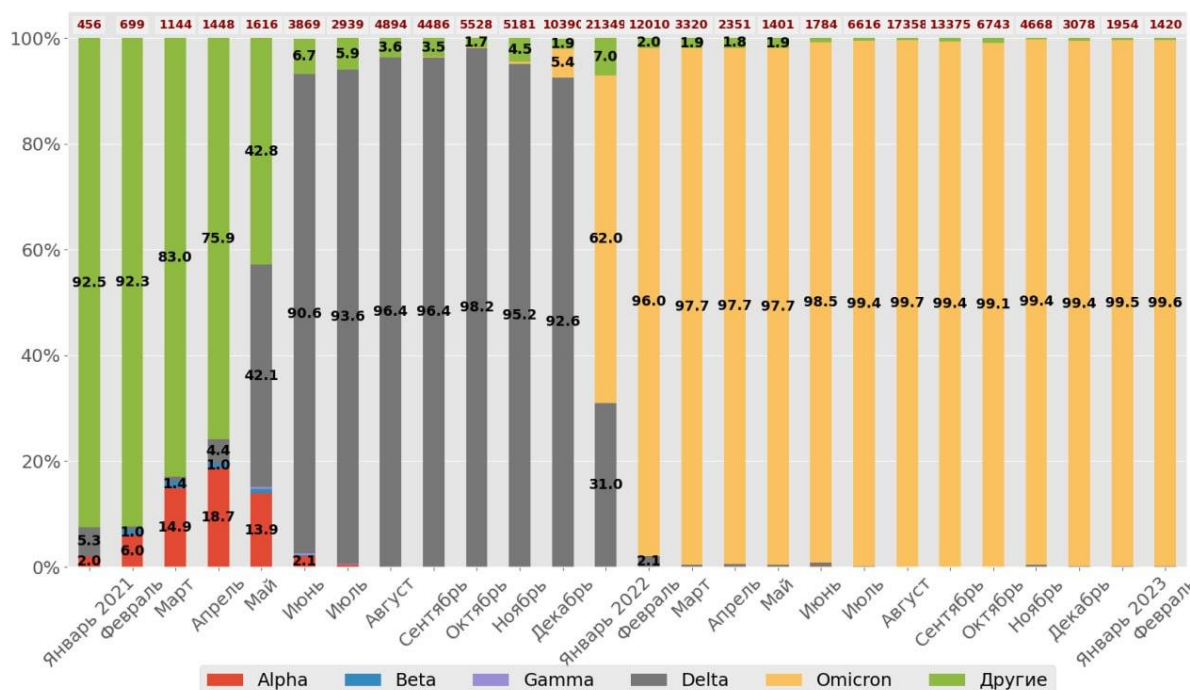


Рисунок 1. Временная динамика вариантов SARS-CoV-2 по образцам из VGARus

На рисунке 1 представлена динамика изменения генетических вариантов вируса во времени по образцам из базы VGARus. Вверху показано количество загруженных последовательностей в соответствующий месяц.

Загрузка последовательностей может происходить как вручную, так и с использованием API, позволяющего загружать большое количество данных в автоматическом режиме. Загруженные в базу последовательности анализируются программным обеспечением. Сразу после загрузки все сиквенсы

проходят валидацию. Далее, ПО определяет штамм сиквенса. Для полных геномов это делается с помощью программы Pangolin [3]. Для фрагментных сиквенсов Pangolin не подходит, поэтому в ЦНИИЭ было разработано собственное ПО Parus, способное находить ключевые мутации в гене S-белка, определяющее вариант. Своевременное знание последовательности генома вируса важно для создания и обновления праймерных последовательностей, используемых в ПЦР тестах.

Секвенирование вируса осуществляется на различных платформах. Полногеномное секвенирование проводится на Illumina Miseq, Illumina NextSeq, MinION от Oxford Nanopore Technologies, MGI DNBSEQ-G50 с использованием как коммерческих праймерных панелей, так и собственной разработки. Фрагментное секвенирование гена S-белка осуществляется как с использованием NGS (вся последовательность гена), так и секвенирования по методу Сэнгера. Для сборки генома из данных NGS используются программные конвейеры (“пайплайны”) собственной разработки, построенные на основе различных программ, таких как ivar, samtools, Trimmomatic, nanopolish, так и готовые решения от производителя. Общий алгоритм работы “пайплайнов” таков: сначала проводится контроль качества сырых прочтений, отрезаются адаптерные и праймерные последовательности, затем проводится выравнивание прочтений на референсный геном SARS-CoV-2, и далее - сборка консенсусной последовательности, которая затем анализируется ПО Pangolin и NextClade [4], и загружается в базу.

На данный момент ведется активная работа по расширению базы и на другие возбудители вирусных заболеваний, такие как вирус гриппа А/В, вирусы гепатита В/С, вирус ветряной оспы.

Литература

1. VGARus (Virus Genome Aggregator of Russia). <https://genome.crie.ru>. (n.d.). Retrieved March 13, 2023, from <https://genome.crie.ru/>
2. GISAID - gisaid.org. (n.d.). GISAID. <https://gisaid.org/>
3. Rambaut A., Holmes E.C., O’Toole A., Hill V., McCrone J. T., Ruis C., Du Plessis L., Pybus O.G. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature Microbiology*, (2020). 5(11), 1403–1407. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
4. Hadfield J., Megill, C., Bell S. M., Huddleston J., Potter B., Callender C., Sagulenko P., Bedford T., Stadler T. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*, (2018). 34 (23), 4121–4123. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407>

УДК 2788

Конкатенация сегментированных вирусных геномов для анализа реассортации и рекомбинации

А.О. Иванова, А. А. Девяткин

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Геном РНК-вирусов имеет разную организацию. Например, геном семейства Orthomyxoviridae характеризуется сегментированностью, в то время как представители семейства Rhabdoviridae обладают несегментированным геномом [1]. Недавно были описаны новые вирусы с сегментированными геномами из семейства Flaviviridae. До этого открытия считалось, что геном флавивирусов может быть только несегментированным. Таким образом, число вирусов с сегментированными геномами выше, чем предполагалось ранее [2].

Вирусы с сегментированными геномами способны к реассортации – обмену сегментами между родственными вирусами в коинфицированных клетках. Этот процесс наблюдается чаще, чем рекомбинация - обмен между участками нуклеотидов одинаковых сегментов между родственными вирусами. В результате филогенетический анализ нескольких сегментов выборки разных вирусов приведёт к противоречивым результатам. Например, филогенетический анализ объединенных 10 кодирующих областей генома вируса Tilapia lake virus (TiLV) из разных сегментов показал близость изолята BD-2017 с двумя изолятами из Таиланда. При этом филогенетический анализ отдельных сегментов демонстрирует родство BD-2017 с вирусом, обнаруженным в Израиле. В дополнение продемонстрировано разное происхождение изолятов из одного региона. [3] Общепринятый подход к выявлению реассортации включает реконструкцию деревьев различных сегментов и их сравнение, что является трудоемкой и отнимающей много времени задачей. [4]

В данной работе было разработано приложение, которое объединяет сегменты одного вируса в единую последовательность (приложение доступно по ссылке clck.ru/33mYJf). В результате, с

использованием ранее предложенных решений возможна автоматизация поиска рекомбинационных и реассортационных событий в выборках, содержащих большое число вирусов [5]. Для валидации нового подхода использовали несколько наборов данных.

Westgeest et al. показали, что среди 282 вирусов субтипа H3N2 гриппа А происходит реассортация между 4 и 6 сегментами [6]. При помощи приложения, произвели слияние сегментов для каждого изолята вирусов из этой выборки. После этого была построена тепловая карта рекомбинации и реассортации и выбраны участки генома, в которых предположительно происходила реассортация. Затем был построен график соответствия попарных расстояний для выбранных координат. Таким образом, обнаружены вирусы реассортанты. Для доказательства их реассортации были построены график идентичности нуклеотидов и филогенетические деревья, которые обладают разной топологией. (рис.1). Полученные данные подтверждают результаты, описанные в статье Westgeest et al.

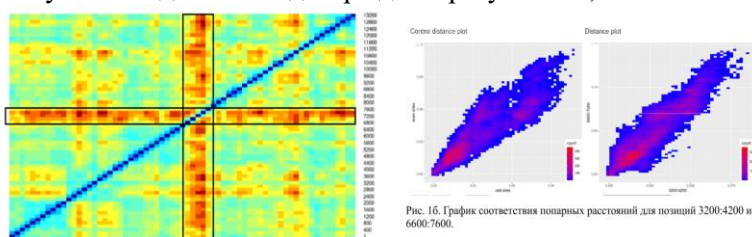


Рис. 1а. Тепловая карта рекомбинации и реассортации субтипа H3N2 вируса гриппа А.

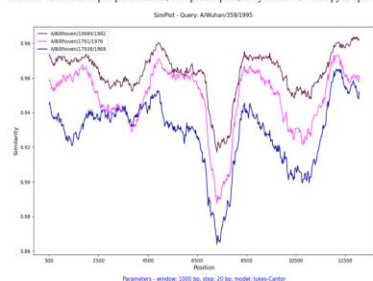


Рис. 1в. График идентичности нуклеотидов для Bihhoven/10684/1982, Bihhoven/1761/1976, Bihhoven/17938/1969. В качестве референса используется Wuhan/359/1995.

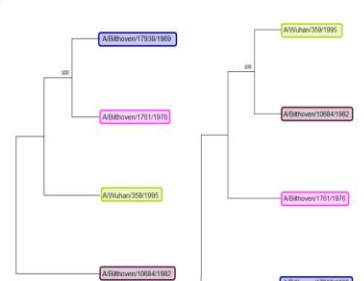


Рис. 1г. Филогенетическое дерево для позиций нуклеотидов 4500-6500.

Рис. 1д. Филогенетическое дерево для позиций нуклеотидов 6500-8500.

Рисунок 1. Поиск реассортации в субтипе H3N2 вируса гриппа А.

Аналогичная работа была проделана для вируса геморрагической лихорадки Крым-Конго. Было обнаружено ранее не описанное событие рекомбинации в первом сегменте вирусов MCL-19-T-1812 и C-68031, MCL-19-T-1812 и UCCR4413.

Таким образом, новый подход автоматизированного поиска событий реассортаций и рекомбинаций для вирусов с сегментированным геномом был валидирован на двух рахных объектах.

Работа сделана при поддержке гранта РФФ № 22-74-10032.

Литература

1. Chaitanya K.V. Structure and Organization of Virus Genomes. In *Genome and Genomics* (pp. 1–30). Springer Singapore, 2019. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0702-1_1
2. Li C.X. et al. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *ELife*, 2015 (4). <https://doi.org/10.7554/eLife.05378>
3. Chaput D.L. et al. The segment matters: Probable reassortment of tilapia lake virus (TiLV) complicates phylogenetic analysis and inference of geographical origin of new isolate from Bangladesh. *Viruses*, 12(3), 2020. <https://doi.org/10.3390/v12030258>
4. Niranjan Nagarajan et al. GiRaF: robust, computational identification of influenza reassortments via graph mining. *Nucleic Acids Research*, Volume 39, Issue 6. 2011. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1232>
5. Vakulenko Y. et al. Modular Evolution of Coronavirus Genomes. *Viruses*. 2021 Jun 29;13(7):1270. doi: 10.3390/v13071270
6. Westgeest K.B. et al. Genomewide Analysis of Reassortment and Evolution of Human Influenza A(H3N2) Viruses Circulating between 1968 and 2011. 2014. *Journal of Virology*, 88 (5). <https://doi.org/10.1128/jvi.02163-13>

UDC 576.315.43

Chromatin accessibility and regulatory epigenome at single cell resolution

L. Shaheen, Y. Medvedeva

Moscow Institute of Physics and Technology (MIPT)

ATAC-seq identifies accessible DNA regions by probing open chromatin with hyperactive mutant Tn5 Transposase that inserts sequencing adapters into open regions of the genome in a process called "tagmentation". The tagged DNA fragments are then purified, PCR-amplified, and sequenced using next-generation sequencing. Sequencing reads can then be used to infer regions of increased accessibility as well as to map regions of transcription factor binding sites and nucleosome positions. The number of reads for a region correlates with how open that chromatin is, at single nucleotide resolution [1].

This project is a part of the Asian Immune Diversity Atlas, representing the pilot in southern populations in Russia. The main aim of it is to analyze single cell data from healthy peripheral blood donors with different ethnical backgrounds to create an atlas of the normal immune system, find the link between specific ethnical polymorphisms with expression of genes in a specific cell type which we can determine by scATAC-seq, following the 10xGenomics scATAC-seq sample and library preparation protocols.

Nevertheless, scATAC-seq's data is very sparse, so the main computational part of this research is to create a good, and reliable data processing protocol.

Imputation of scATAC-seq dropouts is the main solution to the sparsity problem. Many methods were introduced, but there's always limitations mainly due to GPU resources because of the huge datasets, and filtering rare peaks won't help because it could bring bias that can not be described in biological terms.

In this project, our benchmark consists of two components: scATAC processing pipeline and an evaluation procedure. We started processing datasets from count matrices in dense format for smaller datasets or in 10X format for bigger datasets. After that peaks for count matrices are selected using one of three methods: Threshold, Cicero [2], and Boruta [3]. Preprocessed matrix could be additionally imputed by two methods: scOPEN [4] and SCALE [5]. Therefore, nine different imputed matrices are obtained after the first two stages of the pipeline. We used most popular metrics for evaluation of downstream analysis (distance_pca, distance_tsne, distance_umap, hc_ari, hc_ami, hc_homogeneity, kmeans_ari, kmeans_ami, kmeans_homogeneity, louvain_ari, louvain_ami, louvain_homogeneity), and finally we ranked imputation methods by available metrics, calculated the average rank and built the bar plots of rank distributions.

After testing the pipeline for online available datasets of different scales. For BrainTumor dataset¹ with less than 10K cells we discovered that imputation methods do not change metrics for datasets, whereas for datasets like MouseAtlas dataset² with more than 10K cells, imputation methods significantly improves clustering and scoring especially with Cicero preprocessing. The next step is to double-check results of benchmarking over the footprinting tools like RGT-HINT³ by scATAC-seq specific downstream analysis, and finally apply the full protocol on our generated scATAC-seq data.

References

1. Sun Y., Miao N., Sun T. Detect accessible chromatin using ATAC-sequencing, from principle to applications. *Hereditas* 156, 29 (2019).
2. Pliner H.A. et al. Cicero predicts cis-regulatory dna interactions from single-cell chromatin accessibility data. *Molecular cell*, (2018). 71(5), 858–871.
3. Kursa M.B., Rudnicki W.R. Feature selection with the boruta package. *Journal of statistical software*, (2010). 36, 1–13.
4. Li Z. et al. Chromatin-accessibility estimation from single-cell atac-seq data with scopen. *Nature communications*, (2021). 12(1), 6386.
- Xiong L. et al. Scale method for single-cell atac-seq analysis via latent feature extraction. *Nature communications*, (2019). 10(1), 4576

¹ The Breast Tumor dataset is obtained from a mouse breast tumor sample with two plates of tumor cells (Epcam+) and two plates of tumor-infiltrating immune cells (CD45+). We used 4 cell types because authors of SCALE methods have found bias over different plates.

² Mouse Atlas - contains 80000 cells across 13 cell types. Authors of the dataset identified 30 subclusters within tissues. Dataset is available at link: <https://atlas.gs.washington.edu/mouse-atac/>

³ HINT (Hm-based IdeNtification of Transcription factor footprints) is a framework that uses open chromatin data to identify the active transcription factor binding sites. From RGT open source python library

Разработка модели для предсказания температуры денатурации белков методами машинного обучения

А.Д. Гавриленко

Новосибирский государственный университет,
Институт цитологии и генетики СО РАН

Температура денатурации — это температура, при которой белок претерпевает переход из своего нативного состояния (пространственная структура белка необходимая для его функционирования) в денатурированное, неупорядоченное и выпадает в преципитат.

Предсказание температуры денатурации белка, оценка его термической стабильности являются важными задачами для белковой инженерии и биотехнологии.

Существующие алгоритмы машинного обучения, которые явным образом извлекают физико-химические признаки из последовательностей белков обладают ограниченной точностью, один из последних алгоритм ProTstab2 [1], показывающий значение среднеквадратичной ошибки 82.752 на слепой тестовой выборке.

В предложенной работе исследуется метод глубокого обучения для извлечения физико-химических признаков из последовательностей белков как способ построить более точную предсказательную модель.

Описание данных. Данные были получены из базы Meltome Atlas, включают белки 13 видов, 6 прокариот и 7 эукариот. Данные содержат характеристики температур денатурации около 35 000 белков. Термические профили были получены путем нагревания клеток и лизатов. Образцы объединили по температуре и разделили жидкостной хроматографией, затем идентифицировали последовательности с помощью метода масс-спектрометрии [2].

Предварительный анализ данных. Минимальная температура денатурации 27.58°C, максимальная – 98.94°C. В зависимости от имеющейся температуры денатурации, последовательности белков были разбиты на три категории, имеющие температуру ниже 45°C, от 45 до 70°C, свыше 70 °C, соответственно.

Получилось следующее распределение частот в данных:

Белки первой категории - 7520, белки второй категории – 22322, белки третьей категории - 1954.

Основные этапы работы.

- A.** Для получения представлений последовательностей белков использовалась предварительно обученная нейронная сеть Evolutionary Scale Modeling [3], итогом каждой последовательности белка в данных кодируется вектором чисел.
- B.** Для экономии вычислительных ресурсов белки, имеющие длину больше чем 1020 аминокислотных остатков, были удалены из тренировочного набора данных, что составило 5 % от данных.
- C.** Для того, чтобы избежать утечки данных из обучающей в тестовую выборку и разработать алгоритм, обладающий достаточной обобщающей способностью, необходимо было удалить гомологичные последовательности. Для этого использовался алгоритм кластеризации на основе выравнивания белковых последовательностей CD-HIT [4] и впоследствии отобраны наиболее репрезентативные последовательности из каждого кластера. В результате данные стали включать около 21 тысячи последовательностей эволюционно разнообразных белков.
- D.** Так как данные неравномерно распределены, больше всего последовательностей белков средней категории (температура денатурации от 45 до 70°C), была проведена стратифицированная валидация так, чтобы в каждой валидационной выборке средняя температура денатурации белков была одинакова. Это позволит убедиться, что алгоритм качественно работает с белками из каждой категории.
- E.** В качестве алгоритма регрессора использовалась модель TabNet [5]. Подобраны оптимальные гиперпараметры, проведена валидация модели.

Результаты. Обученный алгоритм сравнивался на той же слепой тестовой выборке, что и Prostab 2.

Получены улучшенные метрики:

корреляция Пирсона – 0.8334, MSE = 35.2934, MAE=4.421, RMSE = 5.94083, R2 = 0.68890.

Метрики из статьи Prostab 2:

корреляция Пирсона - 0.8003, MSE = 82.752, MAE=6.934, RMSE = 9.097, R2 = 0.580.

Литература

1. Yang Y., Zhao J., Zeng L., Vihinen M. ProTstab2 for Prediction of Protein Thermal Stabilities // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. 23. 10798. P. 2-11.
2. Jarzab A., Kurzawa N., Hopf T. et al. Meltome atlas—thermal proteome stability across the tree of life // *Nat Methods* 17. P. 495–503.
3. Rives A., Meier J., Sercu T., Goyal S., Lin Z., Liu J., Guo D., Ott M., Zitnick C. L., Ma J., Fergus R. Biological structure and function emerge from scaling unsupervised learning to 250 million protein sequences // 2021 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118(15). P. 1-10.
4. Limin F., Beifang N., Zhengwei Z., Sitao W., Weizhong L. CD-HIT: accelerated for clustering the next generation sequencing data // *Bioinformatics*, (2012), 28 (23): 3150-3152
5. Arik S.O., Pfister, T. TabNet: Attentive Interpretable Tabular Learning. // *ArXiv (Cornell University)* (2019) P. 1-12.

УДК 579.25

Пангеном *Salmonella enterica* - ключ к идентификации молекулярных детерминант патогенности и специфичности выбора организма-хозяина

А.В. Меркушова^{1,2}, А.Е. Шиков^{2,3}, А.А. Нижников^{2,3}, К.С. Антоненц^{2,3}

¹ Санкт-Петербургский Академический Университет

² ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии

³ Санкт-Петербургский Государственный Университет

Salmonella enterica — патогенная бактерия, вызывающая кишечные инфекции как у людей, так и у животных. Тем не менее, несмотря на обширные исследования патогенеза этого микроорганизма, механизмы, лежащие в основе выбора определенного хозяина, остаются малоизученными. С этой целью нами было проведено полногеномное исследование пангенома *S. enterica* для выявления потенциальных факторов специфичности.

Спектр поражаемых хозяев был получен путём объединения из метаданных баз данных Patrik и BioSample. Было выявлено три группы хозяев: человек, копытные животные и птицы. Для реконструкции пангенома были отобраны геномные сборки *S. enterica* полного и хромосомного уровней из базы данных NCBI RefSeq во избежание искажений в соотношении корового и аксессуарного компонентов пангенома, вносимых фрагментированными сборками. Финальный набор данных включал 1600 геномов. Впоследствии сборки были дедулицированы с порогом идентичности 99%, что позволило выделить 300 референсных кластеров, уменьшив количество геномов с очень высокой степенью родства.

Реконструкцию пангенома проводили с помощью инструмента Panaroo [1] с отсечкой в 99% идентичности для выделения ортологов. Пангеном содержал 2796 коровых и 22888 аксессуарных генов. U-кривая не имела внутренних пиков, что также подчеркивает генетическую близость. Вычисленный в соответствии с законом Хипса параметр альфа был равен 0.57, что свидетельствует об открытости пангенома. Исходя из этого можно сделать вывод о большой генетической изменчивости, что также подтверждается большим размером аксессуарного компонента генома.

Для интерпретации эволюционной динамики видового пангенома был использован инструмент RaXML-NG [2] для построения филогенетического дерева на базе однонуклеотидных вариантов в последовательностях коровых генов. При этом сайты, которые были подвержены рекомбинации, были удалены с помощью ClonalFrameML [3]. Отображение метаданных относительно поражаемого хозяина не выявило компактных филогенетических групп, что подчеркивает высокую адаптивность исследуемого микроорганизма и возможность заражать несколько групп хозяев одновременно.

Белковые последовательности всех представителей в пределах пангеномных кластеров были проаннотированы при помощи eggNOG-mapper [4]. Для общей функциональной характеристики пангенома была выбрана система Clusters of Orthologous Groups (COG). Согласно полученным результатам, коровые гены были преимущественно связаны с базовыми клеточными процессами, включая транспорт и метаболизм аминокислот, а также транскрипцию. Аксессуарные гены были ассоциированы с биогенезом клеточной стенки синтезом и транспортом углеводов, секрецией и везикулярным транспортом. Таким образом, можно предположить, что аксессуарные гены могут обеспечивать генетическую изменчивость и потенциально определять специфичность в отношении выбора хозяина.

Для более детального выявления детерминант специфичности было проведено полнопангеномное исследование ассоциаций. Полнопангеномный анализ был проведен с помощью инструмента *pyseer* [5] на базе матрицы присутствия/отсутствия и референсного филогенетического дерева. Потенциальных детерминант специфичности в отношении копытных животных и птиц, было 120 и 35 соответственно. Отсутствие отдельных детерминант по отношению к человеку может быть следствием того, что серовары, имеющиеся в референсном наборе данных, представлены штаммами-генералистами, способными заражать множество групп хозяев, включая человека. К наиболее важным находкам, связанным с заражением птиц, относятся эффекторы, потенциально регулирующие характер инфекции во время заражения макрофагов, в частности, мембранный калиевый канал, ингибитор протеазы FtsH, транскрипционный регулятор MgrB, а также факторы, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам, к которым относятся рибокиназа, белок MFS, регулятор ответа на тетрациклин TetR. Геномы штаммов, изолированных из копытных животных, были обогащены компонентами оперона *tra*, фланкирующего плазмиду с факторами вирулентности, белками поверхностных пилей, участвующих в узнавании клеток хозяина, и компонентами синтеза молибденовых кофакторов, входящих в ферменты, активирующиеся на поздних этапах инфекции, а также многочисленными факторами резистентности к антибиотикам, включая β -лактамы, стрептомицин и аминогликозиды. Наборы выявленных детерминант соотносятся с их функциональными характеристиками в системе Gene Ontology (GO): белки, участвующие в инфицировании птиц, функционально обогащены категориями метаболизма антибиотиков, активности оксидоредуктазы, внутренними компонентами клеточных мембран и наружной мембраной, тогда как заражение копытных включает функциональные обогащения связывания белков и малых молекул, периплазматического пространства и клеточной капсулы. Особый интерес представляет предполагаемая устойчивость штаммов к разным антибиотикам, что может отражать использование различных групп антибиотиков на птицефабриках и фермах.

Таким образом, выявленные детерминанты специфичности можно разделить на две группы: непосредственные компоненты инфекции и факторы, отражающие специализацию к клеточной среде поражаемого хозяина.

Исследование выполнено при поддержке гранта президента РФ МД-2302.2022.5

Литература

1. *Tonkin-Hill G. et al.* Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline // *Genome Biol.* 2020. V. 21(1):180. doi: 10.1186/s13059-020-02090-4.
2. *Kozlov A.M., Darriba D., Flouri T., Morel B., Stamatakis A.* RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference // *Bioinformatics.* 2019. V. 35(21). P.4453–4455. doi: 10.1093/bioinformatics/btz305.
3. *Didelot X., Wilson D.J.* ClonalFrameML: Efficient Inference of Recombination in Whole Bacterial Genomes // *PLoS Comput Biol.* 2015. V. 11(2): e1004041. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004041.
4. *Cantalapiedra C.P., Hernández-Plaza A., Letunic I., Bork P., Huerta-Cepas J.* eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale // *Molecular Biology and Evolution.* 2021. V. 38(12). P. 5825–5829. doi: 10.1093/molbev/msab293.
5. *Lees J.A., Galardini M., Bentley S.D., Weiser J.N., Corander J.* pyseer: a comprehensive tool for microbial pangenome-wide association studies // *Bioinformatics.* 2018 V. 34(24). P. 4310-4312. doi: 10.1093/bioinformatics/bty539.

УДК 578.834.1

Специализированная программа V-TRACE для типирования линий SARS-CoV-2 по нуклеотидной последовательности гена S-белка

М.Р. Аглетдинов^{1,2}, К. Ф. Хафизов^{1,3}

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

²Высшая школа экономики (национальный исследовательский университет)

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Спустя 3 года пандемии новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 не остановился в своей эволюции - постоянно появляются новые варианты, в связи с чем актуальность их типирования по-прежнему велика.

На сегодняшний день существует несколько подходов к типированию варианта вируса. По полной нуклеотидной последовательности всего генома, полученной с помощью данных, генерируемых методами секвенирования нового поколения NGS (от англ. Next Generation Sequencing), а также лишь по его части, обычно по нуклеотидной последовательности гена S-белка (полученной, например, секвенированием по методу Сэнгера).

Для типирования по полной последовательности генома на практике широко используется программное обеспечение (ПО) Pangolin [1], основанное на различных ML алгоритмах классификации. Тем не менее, в силу того, что целью создания данного ПО было типирование линий SARS-CoV-2 по полной последовательности генома, оно крайне плохо справляется с задачей типирования фрагментных геномов.

Несмотря на то, что набор мутаций в гене S-белка сравнительно хорошо коррелирует с типом варианта, точность предсказаний по понятным причинам хуже, чем у программ, которые анализируют геном целиком, не говоря уже о том, что некоторые линии теоретически неотличимы только по последовательности гена спайкового белка (например, BA.4 и BA.5). С точки зрения более глубокого анализа гораздо более полезной информацией являются результаты NGS: помимо задачи сборки генома из сырых прочтений можно получить тонкие зависимости, которые при должном анализе могут привести к глобально более полному пониманию эпидемиологической обстановки, что в свою очередь компенсирует на первый взгляд более дорогой эксперимент.

Тем не менее, до сих пор многие лаборатории в силу ряда причин, в основном, экономического характера, секвенируют лишь ген S-белка SARS-CoV-2, и такие данные требуют отдельной обработки. В связи с этим встал вопрос создания собственного ПО, которое позволило бы в условиях появления новых линий вируса корректно их типировать.

Так изначально появилась программа PARuS (от англ. Polymorphism Analysis of Russian SARS-Cov-2), которая на ранних этапах пандемии применялась для типирования линий SARS-CoV-2. Она имела ряд недостатков: неполная база известных линий вируса, отсутствие многих целевых мутаций для данной линии, некоторые фрагменты программного кода описывали не совсем корректные инструкции, а также финальное заключение о линии вируса не соответствовало по своей форме заключению Pangolin. Таким образом, программа оказалась не готовой к стремительному появлению новых линий с большим числом мутаций в гене спайкового белка, таких как XBB*, BA.2.75*.

Поэтому нами было создано новое ПО под названием V-TRACE (Virus Tracing and Identification using Spike Protein Sequences). На сегодняшний день оно может распознавать все линии SARS-CoV-2, представленные на рисунке 1. Была пересмотрена финальная скоринговая функция, которая стала более корректно оценивать меру правдоподобия для каждой линии.

Суть алгоритма заключается в том, что для каждой линии SARS-CoV-2 (в случае наличия мутаций в гене спайкового белка по сравнению с предковой линией) определяется набор нуклеотидных мутаций с частотой встречаемости 0.65. Затем для данного образца происходит выравнивание последовательности на референсный геном и поиск нуклеотидных отличий. После чего для каждой линии из базы программы происходит определение “меры правдоподобия” принадлежности данного образца к ней.

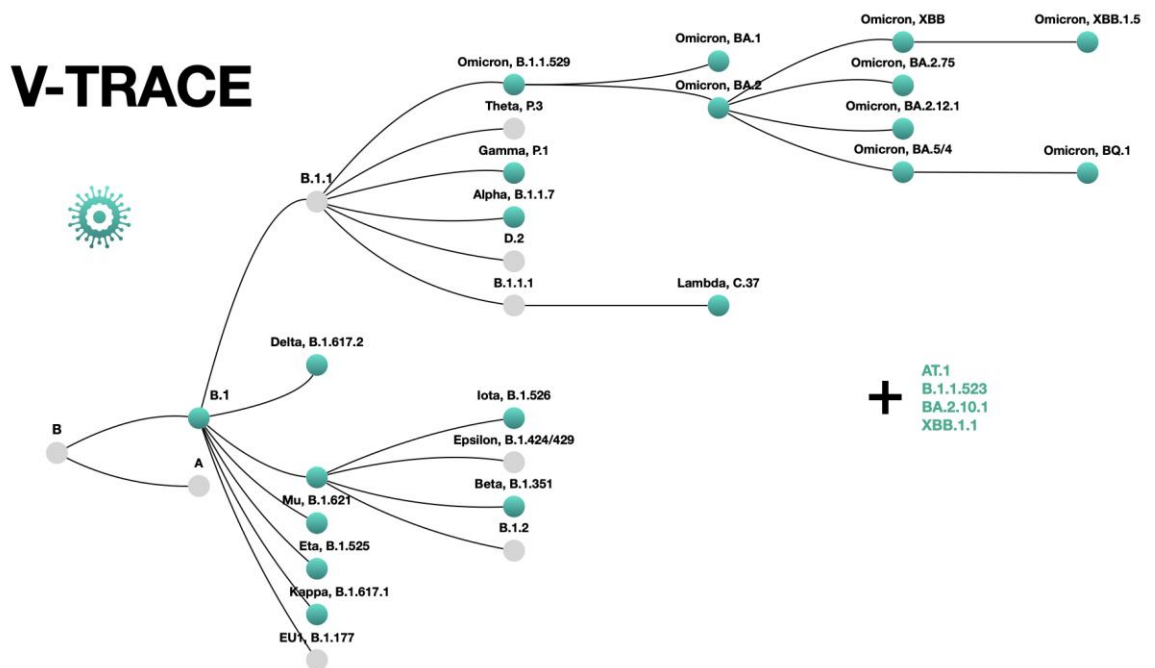


Рисунок 1. Линии SARS-CoV-2, определяемые V-TRACE [2]

Новая версия программы апробирована на портале VGARus (Virus Genome Aggregator of Russia) [3] и на данный момент используется для рутинного анализа данных фрагментного секвенирования.

Литература

1. Rambaut A., Holmes E.C., O'Toole A., Hill V., McCrone J.T., Ruis C., Du Plessis L., Pybus O.G. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature Microbiology*, (2020). 5(11), 1403–1407. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
2. Hadfield J., Megill C., Bell S.M., Huddleston J., Potter B., Callender C., Sagulenko P., Bedford T., Stadler T. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*, (2018). 34(23), 4121–4123. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407>
3. VGARus (Virus Genome Aggregator of Russia). <https://genome.crie.ru>. (n.d.). Retrieved March 13, 2023, from <https://genome.crie.ru/>

УДК 575

Сравнительный анализ A-to-I редактирования РНК в тканях человека

М.Р. Аглетдинов, А.Н. Фёдоров

Высшая школа экономики (национальный исследовательский университет)

Помимо классики процессинга РНК у эукариота (сплайсинг, экзонирование, полиаденилирование) [1] существуют несколько более экзотичных подходов к внесению изменений в транскрибированную последовательность (инделлы, химические модификации, замены) [2]. Они могут влиять на активность, локализацию и стабильность конформации РНК, а также на структуру и функции белка (для белок-кодирующих последовательностей) в случае редактирования CDS области РНК. В человеческих клетках подавляющее число событий редактирования РНК приходится на дезаминирование аденозина с образованием инозина (A-to-I редактирование РНК). Данная реакция в основном катализируется продуктами трансляции гена ADAR1, причем их активность значительно варьируется в различных тканях. Причина такого разнообразия до сих пор не до конца ясна [3].

Исследователи ADAR1 склоняются к тому, что его основная роль заключается в подавлении интерферонного ответа первого типа на собственные транскрипты двухцепочечной РНК (дцРНК). Нарушение этой функции напрямую связано с различными аутоиммунными заболеваниями, такими как Айкарди – Гутьер синдром [4]. Следовательно, улучшение понимания регуляции редактирования имеет большую клиническую значимость.

Дополнительно известно, что большинство сайтов редактирования находится в Alu-повторах. Действительно, после пересечения аннотированных сайтов редактирования с сайта REDIPortal [5] с разметкой различных семейств повторов [6], мы убедились в этом. Но значит ли это, что подобный

результат обусловлен биологической уникальностью Alu-повторов? Он может быть вполне ожидаем, например, из-за большого количества таких элементов в геноме.

Поэтому мы сконструировали статистический тест, который заключается в том, что нами были взяты все описанные сайты редактирования и разбросаны случайным образом на гены. Затем мы провели пересечение с разметкой повторов и повторили это тысячу раз. Для каждого типа повтора было получено распределение числа сайтов редактирования и произведено сравнение с ожидаемым числом сайтов. Так было показано, что семейство Alu-повторов, а также некоторые типы простых повторов действительно являются обогащенными редактированием (рис. 1).

Поэтому для последующего сравнительного анализа мы использовали метрику AEI (Alu editing index), которая как раз построена исключительно на предположении, что ADAR1 в основном редактирует данное семейство повторов [7]. Она представляет из себя отношение суммарного числа событий редактирования в Alu-повторах к сумме событий редактирования и его отсутствия.

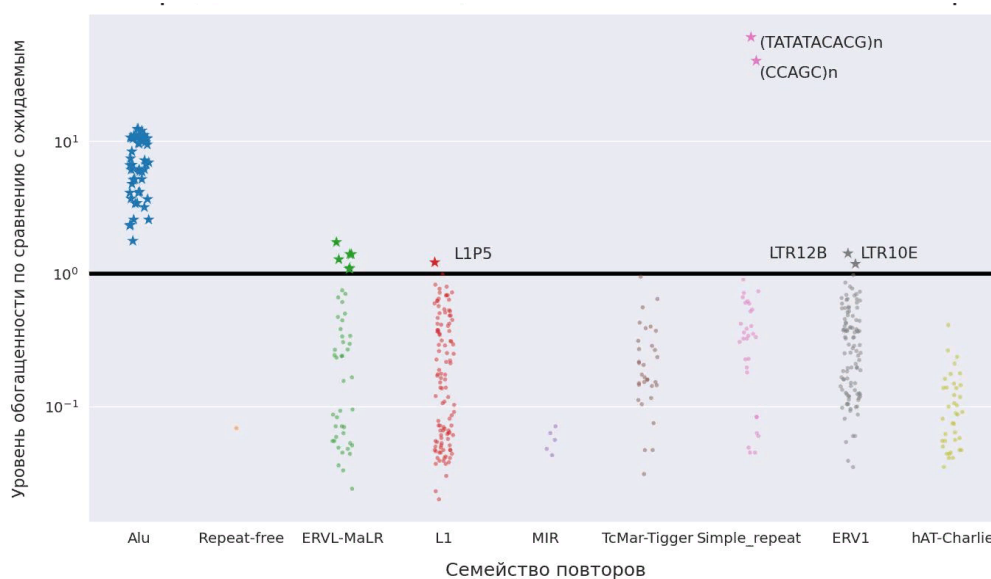
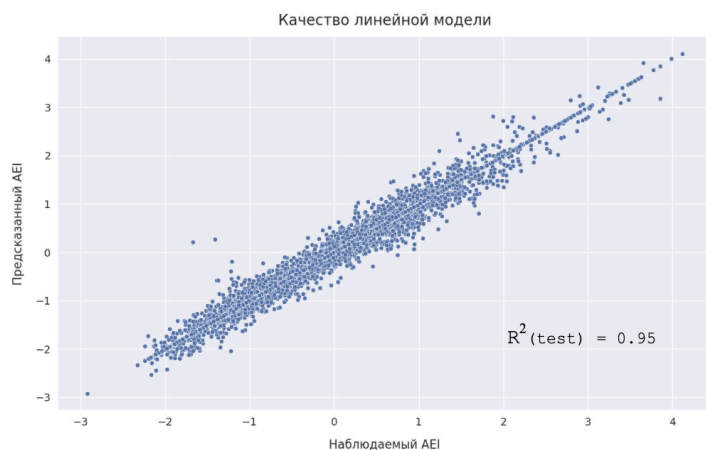


Рисунок 1. Распределение обогащенности редактированием по семействам повторов.

Затем мы обратились к результатам проекта GTEx, а именно к таблице экспрессий всех генов человека для семи с половиной тысяч образцов пятидесяти двух тканей. В результате анализа корреляций между активностью адара (AEI) и его экспрессией было установлено, что существуют ткани с высокой степенью корреляции, низкой, а также ткани, в которых корреляция совсем отсутствует. Затем мы решили проверить, есть ли зависимость активности с экспрессиями других генов.



Lasso-регрессия

α	0.1	0.3
Число значимых генов	71	24
R^2 (средний)	0.83	0.57

LINC01578 PCDHB10 PRSS53 RP11-356B19.11 GUK1 LINC00115 **N4BP2L1** TRAF3IP2-AS1 ITGA9-AS1 IMMP1LP1 SUMO4
RP11-513M16.7 RN7SL608P PMS2P4 RP11-73M18.6 AC073410.1 RP11-798M19.6 CTD-2515A14.1 RP11-216B9.9 TTN
FASTKD5 PGM1 **AIMP2** USP35

В результате нами была сконструирована и протестирована линейная модель, которая отлично предсказывает активность ADAR1 по экспрессиям генов. Затем была применена l1-регуляризация с целью уменьшения количества генов с ненулевым весом: при коэффициенте регуляризации 0,1 число значимых генов равно 71. При более сильном штрафе число значимых генов удалось уменьшить до 24, при этом модель до сих пор достаточно хорошо справляется с задачей предсказания (рис. 2). Среди найденных генов, потенциально значимых для регуляции активности ADAR1, в литературе описаны четыре. Это позволяет предположить, что и другие результаты могут быть не артефактами обучения, а потенциальными регуляторами ADAR1.

Рисунок 2. Регрессионная линейная модель

Литература

1. *Hocine S., Singer R.H., Grünwald D.* RNA processing and export // Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2010. – Т. 2. – No. 12. – С. a000752.
2. *Sun Z. et al.* Indel detection from RNA-seq data: tool evaluation and strategies for accurate detection of actionable mutations // Briefings in bioinformatics. – 2017. – Т. 18. – No. 6. – С. 973-983.
3. *Lamers M.M., Van den Hoogen B.G., Haagmans B.L.* ADAR1: “editor-in-chief” of cytoplasmic innate immunity // Frontiers in immunology. – 2019. – Т. 10. – С. 1763.
4. *Song B. et al.* The role of RNA editing enzyme ADAR1 in human disease // Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. – 2022. – Т. 13. – No. 1. – С. e1665.
5. REDiportal. URL: <http://srv00.recas.ba.infn.it/atlas/>
6. RepeatMasker. URL: <https://repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>
7. *Roth S.H., Levanon E.Y., Eisenberg E.* Genome-wide quantification of ADAR adenosine-to-inosine RNA editing activity // Nature methods. – 2019. – Т. 16. – No. 11. – С. 1131-1138.

УДК 57.081.23

Функциональный протеомный анализ бактерий и микробиомов методом ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрии

*Е.М. Казакова^{1,2}, М.В. Иванов^{1,2}, Т. Куцаинова^{1,2}, Ю.А. Бубис², В. Горшков³,
Я.А. Делеган⁴, И.П. Соляникова^{4,5}, Ф. Кьелдсен³, М.В. Горшков², И.А. Тарасова²*

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт энергетических проблем химической физики им В.Л.Тальрозе ФИЦ ХФ РАН

³Факультет биохимии и молекулярной биологии, Университет Южной Дании

⁴ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)

⁵Белгородский государственный национальный исследовательский университет

Микроорганизмы являются важным компонентом биологических систем. Так, например, многообразие бактерий и их активность в пищеварительном тракте человека влияют на иммунную систему. Также бактерии являются неотъемлемым компонентом биогеохимических циклов химических элементов. В связи с этим исследование микробиомов различных биологических моделей является актуальным направлением в современной науке. Существует множество методов для изучения микробиомов, основанных на анализе различных типов биомолекул: ДНК, РНК и белков. Так, метагеномика исследует многообразие генетического материала, изолированного из образца, и позволяет установить видовое разнообразие в нем. Метатранскриптомика дает понимание об экспрессии генов на уровне транскриптов, а метапротеомика - на уровне белков микроорганизмов, входящих в состав микробного сообщества, позволяя определять изменения в функциональной активности биологических процессов. Хроматомасс-спектрометрия высокого разрешения является одним из широко применяемых методов для протеомного анализа микробиомов. Однако классические методики, предполагающие анализ одной пробы в течении нескольких часов, делают протеомные исследования слишком дорогостоящими. В этом исследовании мы представляем адаптацию метода ультра-быстрого протеомного анализа DirectMS1 к исследованию отдельных бактерий и бактериальных сообществ [1].

Основными задачами при разработке метода были: 1) определение состава микробиома; 2) анализ изменений количественного состава микробиома между разными образцами; 3) анализ изменения активности метаболических путей. В данном исследовании мы сосредоточились на

разработке алгоритмов биоинформатического анализа масс-спектрометрических данных. На первом этапе был реализован двухстадийный поиск по белковым базам данных для определения видового состава образца. Алгоритм был разработан и протестирован на данных литературы [2,3]. На втором этапе было выполнено сравнение микробиомных образцов между собой на основе распределения относительного количественного содержания пептидов, идентифицированных у каждого из организмов. Это позволило выявить изменения состава микробиома, а также определить изменившиеся функционально-связанные группы белков. Для разработки методики количественного анализа метапротеомных данных были разработаны модельные микробиомы. Одной из основных задач при составлении модельных образцов являлось определение диапазона изменений количественного содержания штаммов, который может быть детектирован при помощи предлагаемой методики. Включение в состав модельных микробиомов штаммов, характеризующиеся большим сходством на уровне пептидов, позволило определить, что метод DirectMS1 способен различать родственные штаммы. На третьем этапе был выполнен анализ изменений активности метаболических путей при попарном сравнении образцов. Аннотация и анализ обогащений геномных онтологий, а также оценка активности сигнальных путей была апробирована на данных, отражающих изменения протеомов бактериальных штаммов при культивировании в средах различного состава. Было показано, что метод DirectMS1 обладает чувствительностью, достаточной для определения активности метаболических процессов, связанных с разложением поллютантов и/или биосинтезом веществ.

Клеточные и геномные работы выполнены при поддержке гранта РФФИ №19-54-80003. Протеомные исследования выполнены при поддержке гранта РНФ №23-45-00012. Группа благодарит профессора В.Г. Згуду и ЦКП “Протеом человека” ИБМХ.

Литература

1. *Ivanov M.V. et al.* Boosting MS1-only Proteomics with Machine Learning Allows 2000 Protein Identifications in Single-Shot Human Proteome Analysis Using 5 min HPLC Gradient // *J. Proteome Res.* 2021. Vol. 20, № 4. P. 1864–1873.
2. *Van Den Bossche T. et al.* Critical Assessment of MetaProteome Investigation (CAMPI): a multi-laboratory comparison of established workflows: 1 // *Nat. Commun. Nature Publishing Group*, 2021. Vol. 12, № 1. P. 7305.
3. *Lasch P. et al.* Identification of Microorganisms by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS1) and in Silico Peptide Mass Libraries // *Mol. Cell. Proteomics MCP.* 2020. Vol. 19, № 12. P. 2125–2139.

УДК 579.61

Использование машинного обучения для характеристики микробиоты пациентов с депрессивным расстройством

И.Ю. Ангелова^{1,2}, А.С. Ковтун²

¹Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Депрессивные расстройства являются одной из проблем современного здравоохранения. От них по оценкам Института показателей и оценки здоровья страдает 3,8% населения (около 280 миллионов человек в мире), в том числе 5% взрослых и около 6% лиц старше 60 лет по данным ВОЗ [1]. Депрессия является главной причиной смерти у подростков от 10 до 19 лет в развитых странах [1]. В России за последний год количество проданных упаковок антидепрессантов, транквилизаторов и нейролептиков выросло на 30 % осенью в 2022 году по сравнению с осенью 2021 года по оценкам DSM Group.

Депрессивные расстройства относятся к болезням, имеющим комплексную этиологию. Это влечет за собой потребность изучать различные возможные причины развития заболевания, а также использовать для этого разные подходы, например, изучение связи депрессивных расстройств с микробиотой по оси «микробиота-кишечник-мозг» [2]. Развитие методов секвенирования привело к увеличению количества исследований в метагеномике в контексте психического здоровья. В ряде работ показана связь диеты и состояния кишечника с эмоциональным и психическим состоянием человека [3]. Также изучение отдельных бактерий показало их способность участвовать в метаболических процессах, связанных с выработкой нейромодуляторов [4].

Актуальностью работы является исследование депрессивных расстройств в связи с изменениями микробиоты кишечника. Проблемы, связанные с анализом такого многомерного объекта, как микробиота, для выявления ее связи с ментальными заболеваниями могут быть частично решены с помощью машинного обучения [5]. Классические методы машинного обучения показали некоторые успехи в классификации образцов. RandomForest дает неплохие результаты в работах об ассоциации болезни с микробиотой [6]. Также используют такие модели, как линейная регрессия, сверточные нейронные сети и другие. Некоторые из них показывают неплохие результаты в метагеномном анализе, однако сложно однозначно выделить наиболее эффективные методы для данной задачи. В настоящей работе мы постарались объединить метод метагеномных сигнатур [7] и методы машинного обучения [5] для классификации метагеномных образцов.

Анализ проводился на данных микробиоты кишечника 75 человек из московского региона (38 — здоровые, а 36 — пациенты с депрессией). Таксономический анализ был проведен с помощью Kraken2 [8]. Открытые рамки считывания были определены с помощью MetaGeneMark [9], были проаннотированы с помощью BLASTp [9], а их бактериальное происхождение выявлено с помощью Kraken2 [8]. В результате были получены метагеномные сигнатуры, которые были представлены в виде пар “бактерия-ген”, а их представленность - в виде ридкаунтов. На основе этих данных были дополнительно сгенерированы синтетические данные с помощью генеративной-состязательной нейронной сети (GAN). Расширенная выборка позволит применить методы машинного обучения.

В статистическом анализе метагеномных сигнатур была выявлена связь между исследуемым заболеванием и *Faecalibacterium*, на уровне вида эту связь отражает *Faecalibacterium prausnitzii*. Корреляционный анализ между метагеномными сигнатурами и показателями тяжести заболевания CES-D и HAMD-17 отразил слабые корреляции, наиболее значительные показали данные пары (asparagine synthetase asnA; *Faecalibacterium prausnitzii*), (glutamine synthetase; *Faecalibacterium prausnitzii*), (estradiol 17-beta-dehydrogenase; *Faecalibacterium prausnitzii*), (linoleic acid isomerase; *Faecalibacterium prausnitzii*). С помощью методов машинного обучения были выявлены следующие пары сигнатур с потенциально наибольшим вкладом в развитие депрессии: (argininosuccinate lyase; *Faecalibacterium prausnitzii*), (spermidine synthase; *Roseburia intestinalis*), (glutamate synthase gltB; *Faecalibacterium prausnitzii*), (ornithine carbamoyltransferase; *Ruminococcus*) и (estradiol 17-beta-dehydrogenase; *Faecalibacterium prausnitzii*). Этот поиск был осуществлен для решения задачи с помощью машинного обучения. Анализ показал, что метод RandomForest показал точность 0.80, а метод ElasticNet показал точность 0.55. Изменение представленности этих пар сигнатур в микробиоте кишечника пациентов с депрессией также было описано как значимое с помощью стандартных методов статистического анализа.

Результаты данной работы могут быть использованы в будущих исследованиях связи микробиоты кишечника и проблем ментального здоровья. В дальнейшем они также будут уточняться с использованием новых данных и других методов машинного обучения. Но уже сейчас машинное обучение в сочетании с методом метагеномных сигнатур показывает неплохие результаты в идентификации значимых признаков, которые ассоциированы с болезнью и могут быть использованы как маркеры депрессивных расстройств.

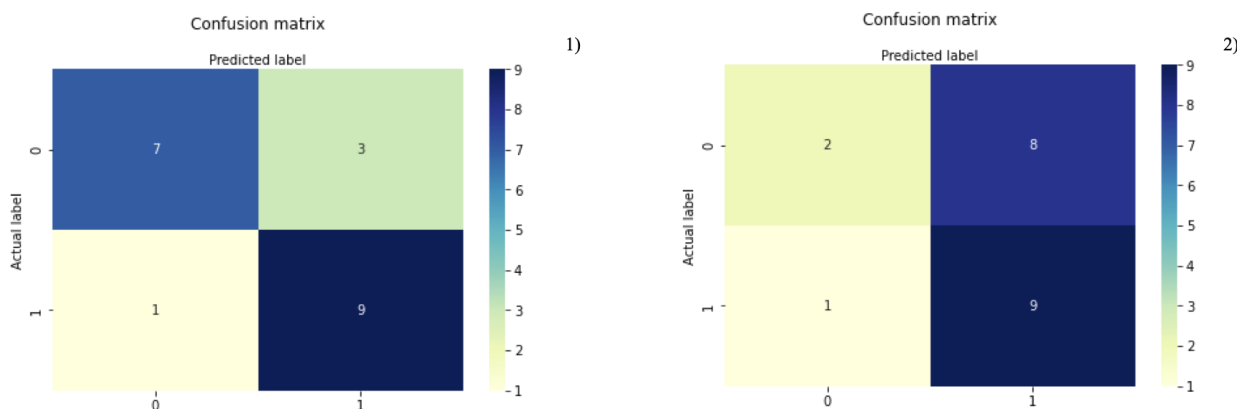


Рисунок 1. Матрица ошибок (confusion matrix) для RandomForest с точностью 0.80 (1) и ElasticNet с точностью 0.55 (2).

Литература

1. *Institute of Health Metrics and Evaluation. Global Health Data Exchange (GHDx).* vizhub.healthdata.org/gbd-results/?params=gbd-api-2019-permalink/d780dffbe8a381b25e1416884959e88b.
2. *Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C.* The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol.* // 2015 Apr-Jun;28(2):203-209. PMID: 25830558; PMCID: PMC4367209.
3. *Jacka F.N., O'Neil A., Opie R. et al.* A randomised controlled trial of dietary improvement for adults with major depression (the 'SMILES' trial). // *BMC Med* 15, 23 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0791-y>
4. *Duranti S., Ruiz L., Lugli G.A., Tames H., Milani C., Mancabelli L., Mancino W., Longhi G., Carnevali L., Sgoifo A., Margolles A., Ventura M., Ruas-Madiedo P., Turroni F.* Bifidobacterium adolescentis as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. // *Sci Rep.* 2020 Aug 24;10(1):14112. doi: 10.1038/s41598-020-70986-z.
5. *Hernández Medina, R., Kutuzova, S., Nielsen, K.N. et al.* Machine learning and deep learning applications in microbiome research. // *ISME COMMUN.* 2, 98 (2022). <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00182-9>
6. *Ai D., Pan H., Han R., Li X., Liu G., Xia L.C.* // Using Decision Tree Aggregation with Random Forest Model to Identify Gut Microbes Associated with Colorectal Cancer. *Genes (Basel).* 2019 Feb 1;10(2):112. doi: 10.3390/genes10020112. PMID: 30717284; PMCID: PMC6410271.
7. *Ковтун А.С., Аверина О.В., Захаревич Н.В., Касьянов А.С., Даниленко В.Н.* In silico определение метагеномной сигнатуры, отражающей нейрометаболический потенциал микробиоты кишечника человека в норме. // *Генетика.* 54. 10.1134/S0016675818090084.
8. *Wood D.E., Lu J., Langmead B.* Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol* 20, 257 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>. PMID: 31779668; PMCID: PMC6883579.
9. *Camacho C. et al.* // BLAST+: architecture and applications. // *BMC Bioinformatics.* 2009. Vol. 10. P. 421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421. PMID: 20003500; PMCID: PMC2803857.

УДК 575.113

Изучение предиктивных биомаркеров терапии таксанами

Д.В. Луппов, М.И. Сорокин, А.А. Буздин

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

В данной работе был проведен анализ ответа пациентов с различными видами злокачественных новообразований на терапию таксанами.

Перед проведением исследования была изучена имеющаяся литература и был сформирован список ожидаемых предиктивных биомаркеров. Также, в процессе изучения статей был сделан вывод, что консенсуса о механизме уничтожения опухолевых клеток таксанами пока нет. В частности, многие работы оспаривали первоначальное предположение о том, что клеточная гибель происходит через апоптоз, вызванный митотическим арестом и непрохождением определенных митотических контрольных точек. Последняя теория подтверждалась на клеточных линиях, но концентрации таксанов в подобных экспериментах значительно превосходили клинически-релевантные значения. В более поздних работах, в которых использовались меньшие концентрации таксанов, было показано проявление другого механизма клеточной гибели - митотической катастрофы и возникновения асимметричного, зачастую мультиполярного, веретена деления [1].

Из последнего противоречия следует, что предиктивные биомаркеры ответа нуждаются в строгой клинической валидации. Более того, данный класс препаратов широко применяется в клинической практике и уже давно является стандартом лечения для многих злокачественных новообразований. Однако не все пациенты отвечают на лечение, содержащее таксаны, поэтому биомаркеры ответа на такую терапию представляют собой не только научную, но и потенциально клиническую значимость.

Для поиска биомаркеров ответа на таксаны мы начали анализ с данных, находящихся в открытой базе Gene Expression Omnibus (GEO). Для отбора датасетов были выбраны следующие критерии включения:

- Количество пациентов > 20
- Ответ на терапию в форме патологического полного ответа (pCR)
- Образцы взяты до терапии
- Транскриптомные профили получены из образцов опухоли пациентов.

- В терапии присутствовали препараты группы таксанов (паклитаксел, доцетаксел, набо-паклитаксел, кабазитаксел)

После просмотра порядка 300 кандидатов по вышеуказанным критериям был выбран 21 датасет с разными локализациями опухоли. Основными диагнозами были рак молочной железы и рак яичников. Каждый набор данных, если это было возможно, был нормализован RMA из необработанных данных (в противном случае использовались предобработанные данные, выложенные авторами исследования), затем 25% наиболее низкоэкспрессируемых генов удалялись из анализа.

Перед тестированием все наборы данных были проверены на наличие batch-эффекта и/или выбросов при помощи PCA. При нахождении batch эффекта датасет удалялся из рассмотрения, при нахождении выброса последний удалялся и проводилась повторная нормализация без него.

На текущий момент, был произведен поиск дифференциальных генов - маркеров ответа на таксаны при раке молочной железы на 7 наборов данных. Тестировались только гены, которые являются общими для всех наборов данных (6790 генов). Для анализа дифференциальной экспрессии использовалась библиотека R LIMMA [2]. Также для каждого датасета были рассчитаны уровни активации сигнальных путей при помощи программного обеспечения Oncobox [3].

Результатом анализа стало обнаружение общих 34 генов и 29 сигнальных путей между всеми наборами данных (рис. 1). Оба эти пересечения были не случайны согласно пермутационному тесту (p -value < 0.001). Анализ терминов генной онтологии (GO) для положительно ассоциированных с ответом на терапию генов показал, что они связаны с процессом образования веретена деления и локализацией белков на центромерах. Отрицательно влияющие на ответ гены не были ассоциированы ни с одним GO термином. Среди активированных сигнальных путей, положительно на ответ влияли пути репликации и митоза, в частности сигнальный путь AURORA Kinase B. Повышенная экспрессия гена *CCND1* продемонстрировала наиболее достоверную связь с отсутствием ответа на терапию таксанами. *CCND1* был значимо дифференциально экспрессирован между ответчиками и неответчиками на лечение после поправки на множественные сравнения в 5 из 7 наборов данных. Оба этих эффекта (связь ответа с *AURKB* и *CCND1*) ранее были описаны в литературе [4][5].

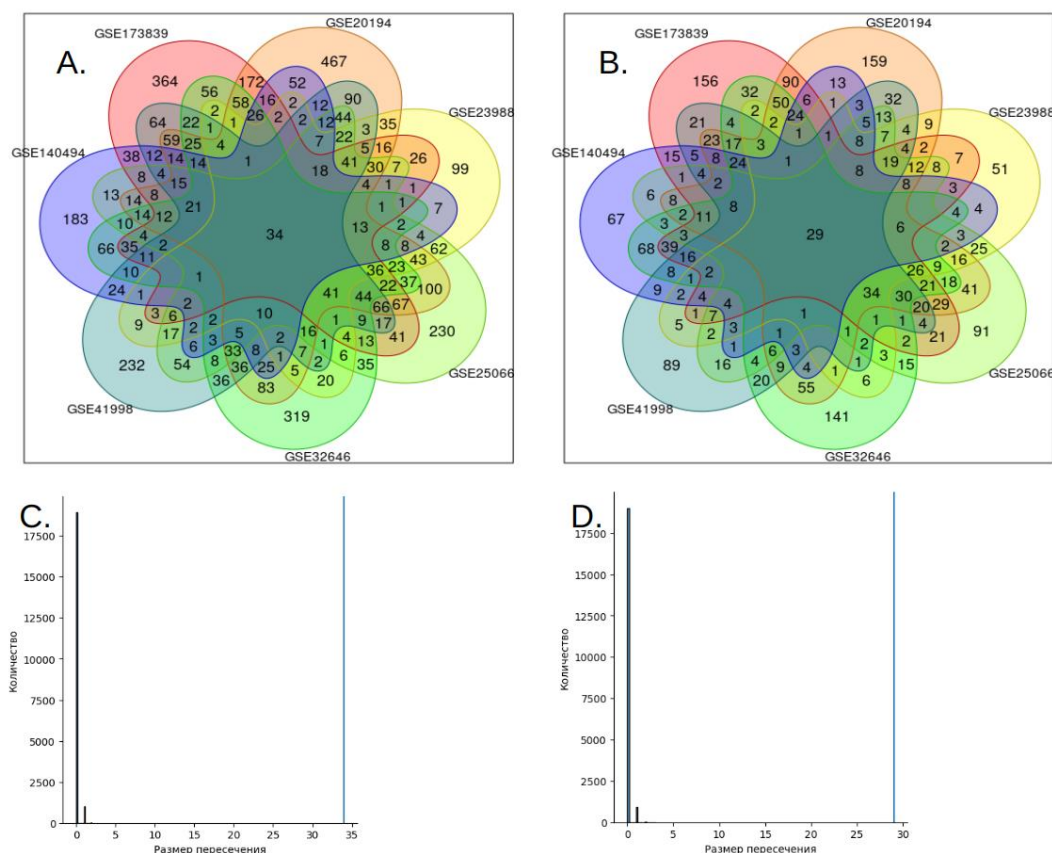


Рисунок 1. Диаграмма Венна для 7 датасетов рака молочной железы (А, В). Распределение значений А - гены, В - сигнальные пути.

В дальнейшем мы планируем составление экспрессионной подписи и создание классификатора для прогнозирования ответа на терапию таксанами с использованием полученных данных.

Классификатор будет валидирован на наборах данных, полученных из других баз данных, в том числе базы генотипов и фенотипов (dbGaP).

Литература

1. Weaver B A. et al. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells // Mol. Biol. Cell, 2014. V. 25. P. 2677.
2. Ritchie M.E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43. P. 47.
3. Sorokin M. et al. Algorithmic Annotation of Functional Roles for Components of 3,044 Human Molecular Pathways // Front. Genet. 2021. V. 12.
4. Al-Khafaji A.S. et al. Aurora B expression modulates paclitaxel response in non-small cell lung cancer. // Br. J. Cancer. 2017. V. 116. P. 592.
5. Tanioka M. et al. Transcriptional CCND1 expression as a predictor of poor response to neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab in HER2-positive/ER-positive breast cancer // Breast Cancer Res. Treat. 2014. V. 147. P. 513.

УДК 577.13

Линейные фосфорилированные пептиды - новый класс специализированных метаболитов бактерий

М. Закирова^{1,2}, Д.В. Бикметов^{3,4}, К.В. Северинов^{3,4}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

³Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт»

⁴Центр точного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена РАН

Рибосомально синтезируемые и посттрансляционно модифицированные пептиды (RiPPs) представляют собой широко распространенную группу специализированных метаболитов. Они проявляют множество различных биологических активностей, важных с точки зрения биологии микроорганизмов и представляющих интерес для медицины и биотехнологии. Так, среди RiPPs встречаются окислительно-восстановительные кофакторы, сигнальные молекулы, а также вещества с антибактериальной, противогрибковой и противоопухолевой активностью.

В нашей лаборатории был открыт новый класс бактериальных RiPPs – линейные фосфорилированные пептиды (lpp). Гены синтеза определенного специализированного метаболита в геномах бактерий, как правило, расположены рядом друг с другом, образуя кластеры биосинтетических генов [1, 2]. Кластер lpp состоит из пептида-прекурсора, RRE-белка (RiPP recognition element), пептидазы, киназы, ABC-транспортера и гликозилтрансферазы (рис. 1. А). Пептид-прекурсор состоит из лидерной и коровой частей, последняя после модификации и ограниченного протеолиза превращается в конечный продукт. Белок RRE связывает лидерную часть пептида и направляет ферменты посттрансляционной модификации.

В данной работе филогенетический анализ белков-гомологов RRE lpp совмещен с систематическим сравнительным анализом ассоциированных с ними кластеров биосинтетических генов. Был проведен масштабный поиск гомологов lpp RRE и проанализировано их геномное окружение: выделены семейства белков и определены характерные для них доменные архитектуры. При помощи методов выделения сообществ в сети сходства геномных регионов были выявлены семейства кластеров биосинтетических генов. Также проведено предсказание и анализ соответствующих пептидов-прекурсоров. В результате был установлен основной набор генов, определяющий новое семейство lpp-подобных RiPPs, а также изучено разнообразие пептидов и дополнительных генов, присутствующих в кластерах биосинтетических генов. Кроме того, такой подход позволил обнаружить ещё несколько новых, еще не изученных, семейств RiPPs.

При помощи филогенетического анализа было установлено родство RRE lpp и лассо, обширного и хорошо изученного семейства бактериальных RiPPs [2, 3] (рис. 2). Особый интерес вызывает наличие в лидерной части пептида-прекурсора lpp мотива, характерного для лассо - YxxPxV (рис. 1, Б). Поскольку лассо и lpp относительно часто могут присутствовать в одном геноме одновременно, возникает вопрос о кросс-специфичности: может ли lpp RRE связывать прекурсор лассо и наоборот. При помощи анализа коэволюции пептидов-прекурсоров и RRE мы предсказали аминокислотные остатки, которые могли бы определять специфичность их взаимодействия.

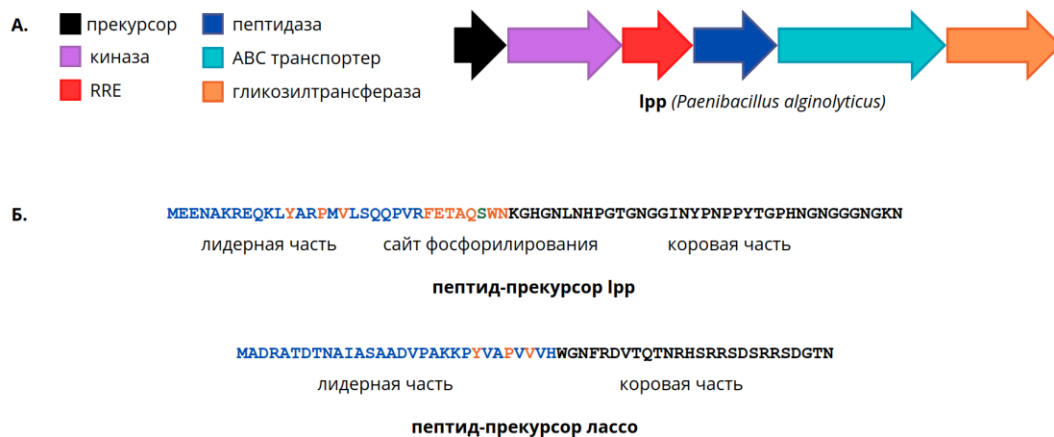


Рисунок 1. А, кластер генов биосинтеза Ipp. Б, пептиды-прекурсоры Ipp и лассо. Синим выделены лидерные части пептидов, оранжевым - консервативные мотивы, зеленым - сайт фосфорилирования Ipp.

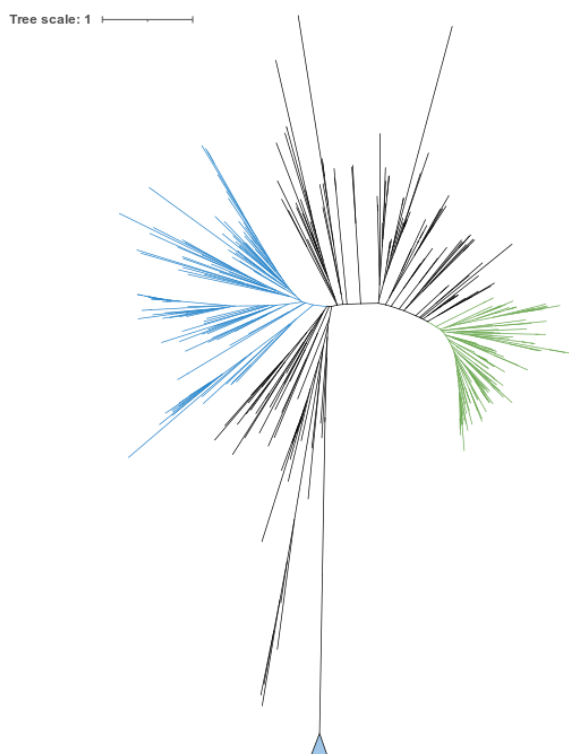


Рисунок 2. Филогенетическое дерево гомологов RE Ipp, построенное методом максимального правдоподобия. Треугольником показана внешняя группа. Цвет ветвей соответствует семейству RiPP: зеленый - Ipp, голубой - лассо.

Литература

1. *Travin D.Y., Bikmetov D., Severinov K.* Translation-Targeting RiPPs and Where to Find Them // *Front Genet.* 2020 Mar 31;11:226.
 2. *Tietz J.I., Schwalen C.J., Patel P.S., Maxson T., Blair P.M., Tai H.C., Zakai U.I., Mitchell D.A.* A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape // *Nat Chem Biol.* 2017 May;13(5):470-478.
- Sumida T., Dubiley S., Wilcox B., Severinov K., Tagami S.* Structural Basis of Leader Peptide Recognition in Lasso Peptide Biosynthesis Path

Исследование предсказательной силы молекулярных путей для различия локализации злокачественных опухолей и связи с выживаемостью.

П.А. Пугачева¹, М.А. Коваленко, М.А. Золотовская, А.А. Буздин, Г.С. Захарова²

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

² Институт персонализированной онкологии Центра «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

Уровень экспрессии генов и активации молекулярных путей являются эффективными диагностическими, прогностическими биомаркерами и биомаркерами лекарственной реакции при многих видах рака [1], [2]. Однако, пути, вручную реконструированные исследователями на основе литературы, могут быть неполными, субъективными и предрасположенными к некоторым “горячим” процессам и молекулам, но в то же время недостаточно полными. В этой работе была использована модель для алгоритмического построения геноцентрических молекулярных путей [3], сосредоточенных вокруг каждого из 7470 генных продуктов интерактома человека. Затем мы оценили их предсказательную способность в сравнении с предыдущим поколением молекулярных путей (3022 “классических” пути) и с отдельными генами (24 862 гена). Для этого, мы исследовали связь уровней активации с типом злокачественного новообразования (ЗНО), общей выживаемостью (ОВ) и выживаемостью без прогрессирования (ВБП) при 21 типе ЗНО человека, используя данные РНК-секвенирования (8141 образец) и протеомные данные (1117 образцов). Вычисление уровня активации молекулярных путей (PAL) проводилось, используя об экспрессии генов в опухоли относительно контроля с помощью программного обеспечения OncoBox [3], [4].

Для выявления биомаркеров, отличающих конкретный тип ЗНО, все анализируемые образцы были объединены и разделены на две группы: интересующий тип ЗНО и остальные. В конечном итоге были получены две метрики для каждого пути (значение PAL) и каждого гена (уровень экспрессии): площадь под кривой ROC (AUC) и p-value из парного теста Уилкоксона (скорректированы FDR в соответствии с методом Бенджамини-Хохберга). Путь или ген считался статистически значимым биомаркером при $AUC > 0,7$ и $q\text{-value} < 0,05$. Все гены, классические и геноцентрические молекулярные пути были проверены на наличие значимых биомаркеров для каждого типа ЗНО (рис.1). Исследование отличия локализаций на протеомных данных не дало достоверного отличия между типами биомаркеров.

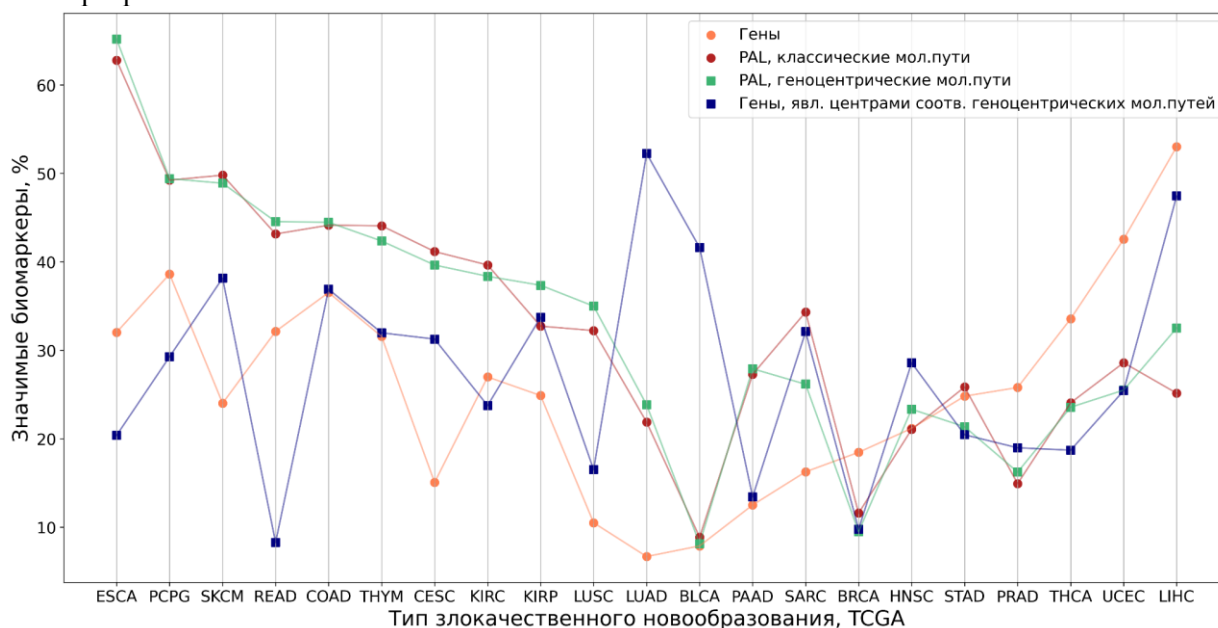


Рисунок 1. Процент значимых биомаркеров для 21 анализируемого типа ЗНО от общего числа протестированных образцов. Сокращения типа рака приведены в соответствии с названиями проектов TCGA.

Затем мы оценили общую выживаемость и способность биомаркеров выживаемости без прогрессирования по трем вышеупомянутым типам молекулярных маркеров и выявили статистически

значимые биомаркеры выживаемости только для 13 из 21 типа рака. Как для ОВ, так и для ВВП наибольшая доля прогностических биомаркеров всех трех типов была обнаружена при папиллярном и светлоклеточном почечно-клеточном раке, а также при гепатоцеллюлярной карциноме. Кроме того, было обнаружено большое количество биомаркеров всех трех типов для ОВ или ВВП при плоскоклеточном раке органов головы и шеи и аденокарциноме предстательной железы соответственно. Мы рассчитали процентное соотношение всех генов, геноцентрических и классических путей, которые были связаны с выживаемостью при различных видах рака, и сравнили результаты (рис.2).

Анализ протеомных данных показал на один порядок меньшее количество значимых биомаркеров, чем данные РНК-секвенирования: только рак поджелудочной железы имеет биомаркеры выживаемости на уровне отдельных белков, геноцентрических и классических молекулярных путей. Кроме того, при раке молочной железы, легких и шейки матки имеется небольшое количество отдельных белков, служащих значимыми биомаркерами выживания.

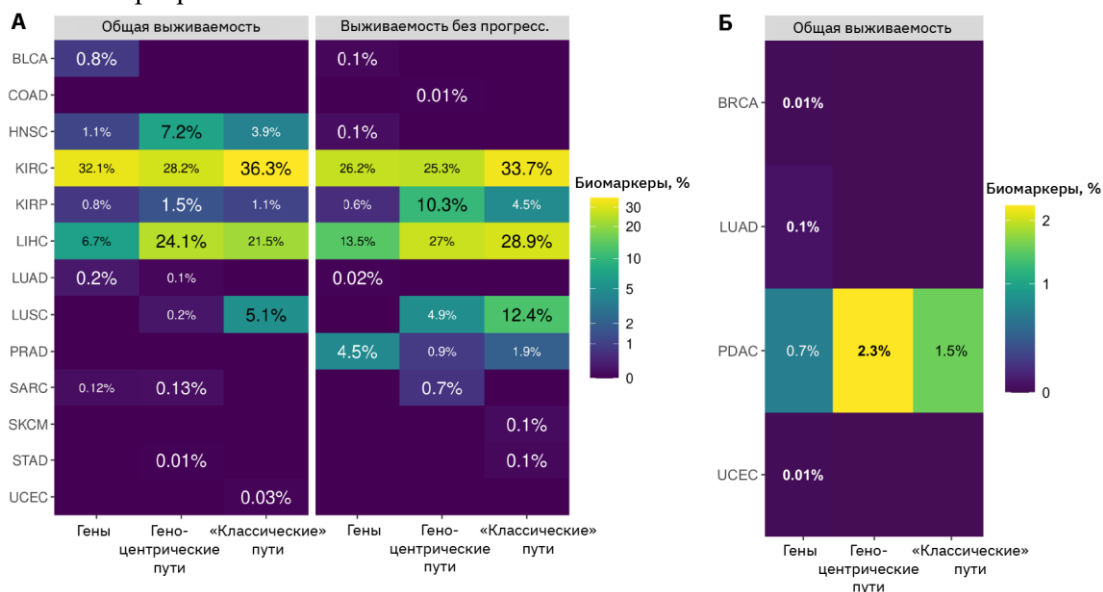


Рисунок 2. Процент потенциальных прогностических биомаркеров для данных А – РНК-секвенирования, Б – протеомных данных. Процентные значения отображаются с помощью логарифмической цветовой шкалы и текстовых меток. Для нулевых значений метки не отображаются; жирным шрифтом выделен процент для категории с наибольшим процентом биомаркеров для каждого типа ЗНО. Сокращения типа ЗНО приведены в соответствии с названиями проектов TCGA.

В целом, было обнаружено, что процент биомаркеров был статистически значимо выше среди путей, как геноцентрических, так и классических, чем среди отдельных генов. В свою очередь, оба типа путей показали сопоставимую эффективность. Таким образом, можно сделать вывод, что уровень активации путей является усовершенствованным типом биомаркеров ЗНО.

Исследование было проведено при поддержке гранта РФФ 22-74-10031.

Литература

1. Buzdin A. et al. Using proteomic and transcriptomic data to assess activation of intracellular molecular pathways, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, vol. 127, pp. 1–53, 2021, doi: 10.1016/bs.apcsb.2021.02.005.
2. Zolotovskaia M.A. et al. Next-Generation Grade and Survival Expression Biomarkers of Human Gliomas Based on Algorithmically Reconstructed Molecular Pathways, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 13, p. 7330, Jun. 2022, doi: 10.3390/ijms23137330.
3. Sorokin M. et al. Igorithmic Annotation of Functional Roles for Components of 3,044 Human Molecular Pathways, *Front. Genet.*, vol. 12, p. 617059, Feb. 2021, doi: 10.3389/fgene.2021.617059.
4. Zolotovskaia M.A. et al. OncoboxPD: human 51 672 molecular pathways database with tools for activity calculating and visualization, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 20, pp. 2280–2291, 2022, doi: 10.1016/j.csbj.2022.05.006.

Сравнительный транскриптомный анализ опухоль-инфильтрирующих В-лимфоцитов памяти, экспрессирующих иммуноглобулины А и G1**Е.В. Щока¹, Д.К. Лукьянов^{2,4}, А.А. Брюшкова^{2,3,5}, Д.М. Чудаков^{2,3,4}, Е.О. Серебровская^{2,3,4}**¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,³НИИ трансляционной медицины – РНИМУ им. Н.И. Пирогова,⁴Сколковский институт науки и технологий,⁵Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

Значимость Т-лимфоцитов в опухолевом микроокружении хорошо изучена, в то время как роль В-лимфоцитов еще остается относительно малоизвестной. В-лимфоциты в опухолевом микроокружении способны производить большое количество антител и цитокинов и оказывать как противоопухолевый, так и проопухолевый эффект. Высокая инфильтрация легочной аденокарциномы (LUAD) В-лимфоцитами коррелирует с положительным прогнозом, в то время как высокая инфильтрация В-лимфоцитами светлоклеточной карциномы почки (KIRC), напротив, коррелирует с негативным прогнозом. Также для некоторых подтипов LUAD инфильтрация В-лимфоцитами, синтезирующими иммуноглобулин G1 (IgG1), коррелирует с положительным прогнозом, в то время как инфильтрация В-лимфоцитами, синтезирующими иммуноглобулин А (IgA), коррелирует с негативным прогнозом. В чем фенотипические отличия синтезирующих IgA и IgG1 В-лимфоцитов на уровне транскриптома и как эти отличия обуславливают влияние В-лимфоцитов опухолевого микроокружения на прогноз течения заболевания?

В данной работе мы проанализировали тотальные транскриптомы опухоль-инфильтрирующих В-лимфоцитов памяти, продуцирующих IgA и IgG1 из образцов опухолевой ткани, полученных от 8 пациентов с LUAD и 11 пациентов из KIRC. Мы обнаружили, что экспрессия гена FCRL4 в В-лимфоцитах LUAD, экспрессирующих IgA, значительно увеличена по сравнению с таковой в лимфоцитах, экспрессирующих IgG ($p_{adj} = 1,21E-30$, $\log_2\text{FoldChange} = -3,77$), однако в KIRC статистического различия между В-лимфоцитами обнаружено не было и экспрессия гена оказалась низкой. Также была обнаружена дифференциальная экспрессия гена RUNX2 ($p_{adj} = 6,67E-5$, $\log_2\text{FoldChange} = -1,73$), которая, по литературным данным, коррелирует с экспрессией FCRL4. Известно, что мембранный белок FCRL4, кодируемый этим геном, может связывать константный домен (Fc) IgA и выступать в качестве супрессора для передачи сигнала от В-клеточного рецептора. По данным The cancer genome atlas (TCGA) экспрессия гена FCRL4 в суммарных опухолевых транскриптомах, нормированная на экспрессию гена CD20, является негативным прогностическим фактором. То есть, высокая доля FcRL4-экспрессирующих лимфоцитов является маркером про-опухолевого фенотипа В-лимфоцитов. Предположительно, экспрессия FcRL4 возрастает на IgA-экспрессирующих В-лимфоцитах при интенсивной стимуляции сигнального каскада В-клеточного рецептора, и, как следствие, высокой продукции иммуноглобулинов изотипа А, что является негативным прогностическим фактором при LUAD.

Для верификации результатов был использован публичный датасет секвенирования одиночных клеток опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток из статьи Leader et. al. [1] и выделены В-лимфоциты памяти. Было обнаружено, что В-лимфоциты, экспрессирующие FCRL4, выделяются в отдельный кластер и анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA) выделяет данный кластер как кластер с экспрессией генов, характерных для ответа на интерфероны альфа и гамма, являющимися провоспалительными белками. В результате выделения IgA⁺ и IgG⁺ клеток в отдельные кластеры было обнаружено, что в IgA⁺ клетках экспрессия FCRL4 > 0 наблюдается в 1.50% от всего количества, а в IgG⁺ клетках экспрессия FCRL4 > 0 наблюдается только в 0.75%.

Таким образом, нами обнаружены значимые отличия в транскриптомных профилях В-лимфоцитов памяти, инфильтрирующих аденокарциному лёгкого, но не светлоклеточный рак почки. Данные различия позволяют идентифицировать уровень FcRL 4 как новый прогностический фактор при аденокарциноме лёгкого, и предположить механизм, лежащий в основе его влияния на прогноз.

Литература

1. Leader A.M., Grout J.A., Maier B.B., Nabet B.Y., Park M.D., Tabachnikova A., Chang C., et al. Single-Cell Analysis of Human Non-Small Cell Lung Cancer Lesions Refines Tumor Classification and Patient Stratification// *Cancer Cell* 39, no. 12 (December 13, 2021): 1594-1609.e12.

Технологии связывания (иммобилизации) коротких некодирующих РНК на поверхности кремниевых наночастиц

В.И. Жадаев¹, Е.В. Масловская²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Московский инженерно-физический институт

Технология малых интерферирующих РНК (siРНК) открывает большие перспективы для лечения различных заболеваний человека путем направленного снижения уровня активности генов [1]. siРНК могут использоваться при терапии злокачественных новообразований, вирусных и генетических заболеваний, а также в регенеративной медицине. Некоторые терапевтические средства, основанные на принципе РНК-интерференции, уже одобрены для клинического применения и доступны на коммерческой основе. Например, препарат Patisiran для лечения наследственного транстриреин-опосредованного амилоидоза (выпущен на рынок в 2018 году) и препарат Givosiran для лечения людей с острой печеночной порфирией (выпущен на рынок в 2019 году) [2,3]. Дальнейшее развитие этого направления терапии зависит от разработки безопасных и эффективных носителей для системной доставки siРНК.

Применение siРНК в терапевтической практике ограничено следующими особенностями:

малые интерферирующие РНК чувствительны к нуклеазам сыворотки крови и имеют возможность неспецифического связывания,

действия siРНК аналогичны по механизму действия miРНК, что приводит к подавлению экспрессии отличных от мишени генов (мРНК которых частично комплементарна области "seed") и активации врожденного иммунного ответа.

Для достижения терапевтического эффекта при системной доставке молекулы малых интерферирующих РНК (siРНК) должны находиться в активной форме во время циркуляции в кровотоке, а также избегать поглощения фагоцитами, фильтрации почками, образования агрегатов с белками сыворотки крови и деградации нуклеазами. Более того, для проникновения в ткани siРНК должны пройти через эндотелиальный барьер, задерживающий молекулы размером более 5 нм. Сосуды селезенки и печени пропускают молекулы размером диаметра до 200 нм. Сосуды опухолей пропускают вещества с молекулярной массой более 40 кДа. Данный эффект носит название усиленный эффект проникновения и удержания, "EPR" (enhanced permeation and retention effect).

Наночастицы пористого кремния (pSiNP) являются перспективными средствами доставки лекарственных средств благодаря их биосовместимости и биodeградируемости. Для доставки siРНК используют pSiNP с различными видами покрытия, такими как полиэтиленмин, оксид графена, силикат кальция, хитозан и многие другие. Вид покрытия наночастиц пористого кремния определяет такие важные характеристики комплекса как клеточный захват комплекса и кривая кинетики выхода siРНК из него, во многом определяющие эффективность терапии с использованием siРНК.

В этой работе мы рассматриваем наночастицы пористого кремния покрытые хитозаном. В течение десятилетий хитозан находил широкое применение в самых разных областях, особенно в фармацевтике. Универсальность хитозана в нативной или функционализированной форме обусловлена его: высокой природной распространенностью, неаллергенностью, биосовместимостью и биоразлагаемостью. В дополнение к этим свойствам положительный заряд молекул делает производные хитозана мощным вектором для нуклеиновых кислот. Хитозан представляет собой сополимер N-ацетил-D-глюкозамина (GlcNAc) и D-глюкозамина (GlcN) и действует как слабое основание благодаря наличию остатка D-глюкозамина. Положительно заряженный хитозан используется для связывания и образования полиплексов с siРНК, имеющих отрицательно заряженный фосфатный остов [4]. Хитозановое покрытие после загрузки олигонуклеотидов значительно улучшает выход олигонуклеотидов и подавляет эффекты пикового выхода.

Целью представленной работы является отработка технологии связывания (иммобилизации) коротких некодирующих РНК (малых интерферирующих РНК, siРНК) на поверхности наночастиц пористого кремния при помощи физического подхода (использования ультразвуковой обработки) и химического подхода (модификация поверхности наночастиц хитозаном). В работе использовали pSiNP, произведенные в лаборатории Бионанопотоники НИЯУ МИФИ.

В ходе работы мы изучили возможность использования термически гидрокарбонизированных наночастиц пористого кремния (THCpSiNPs) и THCpSiNP покрытых хитозаном для доставки терапевтического Canonical олигонуклеотида (siРНК). Были проведены стандартные анализы жизнеспособности клеток НЕК Phoenix, которые показали, что клетки, инкубированные с покрытыми

хитозаном наночастицами в концентрации 0,1 мг/мл, являются жизнеспособными на 95%. Кроме того, хитозановое покрытие значительно усиливает поглощение ТНСрSiNP, нагруженных олигонуклеотидами, через клеточную мембрану. Гистопатологический анализ ткани печени, почек, селезенки и кожи, собранный у мышей, получавших наночастицы, дополнительно демонстрирует биосовместимость наночастиц и отсутствие воспаления в тканях.

Также было проведено исследование кинетики выхода олигонуклеотидов из покрытых хитозаном наночастиц, которое показало устойчивый выход siРНК через 35 часов. Покрытие наночастиц хитозаном замедляет выход siРНК и ограничивает пиковый выход до уровня ниже 8%. С помощью электронного и конфокального микроскопов наблюдали успешную доставку комплекса термически гидрокарбонизированных загруженных наночастиц пористого кремния, покрытых хитозаном и загруженных на них siРНК. Обработанные клетки НЕК Phoenix сохранили высокую жизнеспособность после 48 часов инкубации с указанным комплексом.

Литература

1. *Mahmoodi Ch.G. et al.* Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach //International journal of nanomedicine. – 2019. – С. 3111-3128.
2. *Obici L. et al.* Quality of life outcomes in APOLLO, the phase 3 trial of the RNAi therapeutic patisiran in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis //Amyloid. – 2020. – Т. 27. – №. 3. – С. 153-162.
3. *Syed Y.Y.* Givosiran: a review in acute hepatic porphyria //Drugs. – 2021. – Т. 81. – С. 841-848.
4. *Kafshgari M.H., Delalat B., Tong W.Y., Harding F.J., Kaasalainen M., Salonen J., Voelcker N.H.* Oligonucleotide delivery by chitosan-functionalized porous silicon nanoparticles// NanoRes.2015, 8(6): 2033–2046. <https://doi.org/10.1007/s12274-015-0715-0>
5. *Kafshgari M.H. et al.* Oligonucleotide delivery by chitosan-functionalized porous silicon nanoparticles //Nano Research. – 2015. – Т. 8. – С. 2033-2046.

УДК 620.3

Использование изолированных митохондрий для доставки наночастиц к клеткам и тканям лёгких в организме

А.П. Синицына^{1,2}, И.Н. Иванов², И.В. Зеленукин¹, С.М. Деев^{1,2}

¹Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

²Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Наночастицы – одно из перспективных средств терапии и диагностики заболеваний. Недостаток инструментов для доставки наноматериалов в клетки препятствует их внедрению в медицинскую практику. Мы разработали новый метод транспортировки наночастиц внутрь клеток с использованием изолированных митохондрий.

Митохондрии были выделены из печени мышей BALB/c путем гомогенизации ткани и последующего отделения органелл центрифугированием[1]. Манипуляции проводились при температуре 4°C во избежание активации повреждающих фосфолипаз и протеаз. Целостность органелл была подтверждена при помощи SEM. Они также были охарактеризованы с использованием DLS. Гидродинамический размер в воде составляет 900 нм, митохондрии имеют отрицательный ζ-потенциал.

Затем мы проверили жизнеспособность изолированных митохондрий путем измерения активности мембранных дыхательных цепей. Митохондрии окрашивали красителем Родамин 123, который чувствителен к изменению мембранного потенциала. Снижение относительной флуоресценции наблюдалось при добавлении носителей протонов (аскорбиновой, глутаминовой, янтарной, яблочной кислот в присутствии аденозиндифосфата ADP) и увеличение при добавлении веществ-разобщителей окислительного фосфорилирования и ингибиторов мембранных комплексов (FCCP, ротенон) из-за изменения мембранного потенциала [2]. Вышесказанное свидетельствует о жизнеспособности изолированных митохондрий и отсутствии их значительного повреждения во время изоляции.

Также была протестирована возможность доставки наночастиц на поверхности митохондрий в клетки *in vitro*. Митохондрии окрашивали флуоресцентными наночастицами, избыток которых удаляли центрифугированием, и инкубировали с клетками эпителия мышцы и опухолевыми клетками

человека. Конфокальная микроскопия в динамике показала активное проникновение митохондриального комплекса с наночастицами внутрь клеток.

Следующим шагом стал выбор наночастиц, подходящих для покрытия изолированных митохондрий. Для этого были использованы наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), чья поверхность модифицирована хитозаном[3]. В качестве инкапсулируемого вещества был использован флуоресцентный краситель Nile Blue.

Исследовано время циркуляции наночастиц в кровотоке мыши путём измерения сигнала флуоресценции в последовательно взятых образцах крови. Распределение наночастиц PLGA по органам измерялось при помощи метода количественной визуализации (Ivis Spectrum CT) после полного выведения частиц из кровотока.

В настоящее время продолжается работа по изучению распределения комплекса наночастицы-митохондрии по внутренним органам. Измеряя интенсивность флуоресценции крови со временем, можно судить о циркуляции в кровотоке митохондрий, покрытых наночастицами, а также о распределении комплекса по органам. Предполагается, что данный инструмент подходит для доставки наночастиц к органам с разветвлённой сетью капилляров, таких как лёгкие.

Таким образом, покрытие изолированных митохондрий наночастицами в перспективе может стать инструментом доставки наноматериалов к лёгким, что позволит снизить лекарственную нагрузку и вероятность побочных эффектов лечения и применить технологию как инструмент тераностики таких заболеваний, как различные виды рака лёгких (мелкоклеточный, немелкоклеточный, метастатический), фиброз и т.д.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ, грант 21-74-30016.

Литература

1. *Frezza C., Cipolat S., Scorrano L.* Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* 2, 287–295 (2007)
2. *Baracca A., Sgarbi G., Solaini G., Lenaz G.* Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Sep 30;1606(1-3):137-46.
3. *Shipunova V.O., Sogomonyan A.S., Zelepukin I.V., Nikitin M.P., Deyev S.M.* PLGA Nanoparticles Decorated with Anti-HER2 Affibody for Targeted Delivery and Photoinduced Cell Death. *Molecules* 2021, 26, 3955.

УДК 577.322.23

Сравнение кальций-чувствительного красителя и потенциал-чувствительного красителя в методе имиджинга на клетках, экспрессирующих ноцицептивные рецепторы

Е.С. Дубодел¹, Ю.В. Королькова², С.А. Козлов²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

В настоящее время электрофизиологические методы являются одними из самых информативных при изучении ионных каналов. Однако биоимиджинг является одним из самых быстро эволюционирующих методов изучения мембранных белков, который позволяет исследовать групповое поведение сообщества клеток, а также отслеживать локальные изменения как на мембране, так и внутри клетки. В нашем исследовании мониторинг внутриклеточного кальция проводили с помощью красителя Fluo4, а для изучения мембранного потенциала был взят краситель FLIPR Membrane potential Assay Kit от Molecular Devices, R8126. В качестве исследуемого рецептора был взят неселективный катионный ионный канал TRPV1 (канал переменного рецепторного потенциала ваниллоидный 1), который был гетерологически экспрессирован в клетках, принадлежащих клеточной линии яичников китайских хомячков CHO. На этих клетках мы изучили эффекты нескольких производных 5-алкокси-1-арил-3-полифлуороалкилпиперазолов и пептида HCRG21. Учитывая роль TRPV1 в физиологических процессах, связанных с ноцицепцией, отвечающей за острую чувствительность к гипертермии, нейрогенное воспаление и термическую гипералгезию [1], поиск их ингибиторов актуален. Исследованные молекулы не вызывали активации нетрансфицированных клеток CHO, но успешно оказывали ингибирующее действие при активации TRPV1 селективным агонистом капсаицином, а некоторые проявляли в эксперименте свойство частичного агонизма. Результаты при использовании более традиционного красителя Fluo4 совпали хорошо с данными при использовании R8126, поэтому можно утверждать, что использование флуоресцентного красителя от Molecular Devices R8126 дает

результаты, сопоставимые с получаемыми при контроле внутриклеточного кальция, но более приближены по сути к изучению мембранного потенциала электрофизиологией.

Литература

1. McMahon S., Bennett D., Bevan S. Inflammatory mediators and modulators of pain, 2006, сс. 49–72. doi: 10.1016/B0-443-07287-6/50008-4.

УДК 577.322.5

Исследование структуры комплекса каротиноид-связывающего белка AstaP с молекулой астаксантина

Ф.Д. Корнилов^{1,2}, А.Г. Савицкая¹, С.А. Гончарук², Н.Н. Случанко³, К.С. Минеев^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

³Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН»

Каротиноиды – мощные антиоксиданты, помогающие клеткам справляться с окислительным стрессом. В природе эти молекулы синтезируются растениями и микроорганизмами для защиты от фотоокислительных процессов. Для животных – каротиноиды, попадающие в организм вместе с едой, также несут антиокислительную функцию. Смесь различных каротиноидов защищает человеческий глаз от фотоокислительного стресса [1]. Было обнаружено, что высокое содержание каротиноидов в диете коррелируют с уменьшением риска дегенеративных расстройств, различных видов рака, сердечно-сосудистых и офтальмологических заболеваний [2]. Так как окислительный стресс либо является причиной, либо сопровождает данные заболевания, то используя каротиноиды в качестве антиоксидантов, возможно предупредить, затормозить или остановить их развитие. Однако, высокая гидрофобность молекул каротиноидов является одним из препятствий для их использования в терапевтических целях. Для решения этой проблемы могут подойти природные солубилизаторы – каротиноид-связывающие белки.

AstaP – группа каротиноид-связывающих белков, обнаруженных в различных микроводорослях [3]. Белковый кор AstaP составляет домен FAS I, широко распространенный в различных организмах, от бактерий до человека. Ранее этот домен был описан только для белков клеточной адгезии. AstaPo1 – первый белок, для которого была обнаружена новая функция, которую может выполнять FAS I домен: связывание каротиноидов. Кроме того, в отличие от других ранее открытых каротиноид-связывающих белков, AstaPo1 обладает широкой субстратной специфичностью: он может образовать комплекс с астаксантином, кантаксантином, лютеином, зеаксантином и β -каротином [4], что делает его перспективным агентом таргетной доставки широкого набора каротиноидов.

С целью определить сайт связывания AstaPo1 с каротиноидами, объяснить его лиганд-селективность и заложить основу для дальнейшего рационального дизайна белка, в данной работе методами ЯМР-спектроскопии была определена пространственная структура в растворе комплекса AstaPo1 с молекулой астаксантина.

Работа поддержана грантом Президента РФ № МД 2834.2022.1.4

Литература

1. Arunkumar R. et al. What do we know about the macular pigment in AMD: the past, the present, and the future // Eye. 2018. V. 32. № 5. P. 992–1004.
2. Mayne S.T. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans // FASEB J. 1996. V. 10. № 7. P. 690–701.
3. Kawasaki S. et al. Photooxidative stress-inducible orange and pink water-soluble astaxanthin-binding proteins in eukaryotic microalga // Commun. Biol. 2020. V. 3. № 1. P. 490.
4. Slonimskiy Y.B. et al. Microalgal protein AstaP is a potent carotenoid solubilizer and delivery module with a broad carotenoid binding repertoire // FEBS J. 2022. V. 289. № 4. P. 999–1022.

Рецепторы Trk: структурные особенности и взаимодействие с лекарствами в области мембраны.

Э.Ф. Ком^{1,2}, С.А. Гончарук¹, А.С. Арсеньев^{1,2},
К.С. Минева^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

²Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет)

Нейротрофины - белковые факторы роста, играющие ключевую роль в развитии нервной системы. В последние годы установлено, что они также принимают активное участие и во многих других жизненных процессах нейронов, таких как дифференциация, миграция, апоптоз и синаптическая пластичность. Изменение уровней экспрессии нейротрофинов может приводить к различным пагубным синдромам, таким как боль, агрессия, депрессия, наркотическая зависимость и прочим. Такой спектр проявлений обусловлен не только разнообразием нейротрофинов, но и их рецепторами.

Рецепторы Trk - специфические рецепторы нейротрофинов, среди которых наиболее изучен TrkA. Согласно недавним исследованиям, TrkA является перспективной терапевтической мишенью для лечения не только нейропатий, но и ряда онкологических заболеваний, однако для этого рецептора пока не установлен детальный механизм активации. В то же время другой член семейства Trk, TrkB, скорее всего взаимодействует с психоактивными веществами, в том числе с классическими антидепрессантами [1]. Это особенно интересно в свете сомнений в актуальности серотониновой теории возникновения депрессии [2].

В данной работе методом ЯМР-спектроскопии была исследована связка трансмембранного и примембранного доменов человеческого TrkA нейронального типа, а также трансмембранный домен человеческого TrkB. Была рассчитана первая экспериментальная структура димерного трансмембранного домена TrkB, а также начато исследование его взаимодействия с лекарствами в мембраноподобных средах. Кроме того, установлено, что примембранный регион TrkA не имеет стабильной вторичной структуры, однако через него каким-то образом передается сигнал внутрь клетки. При введении в примембранный регион активирующей мутации K410C, замыкающей белок в ковалентный дисульфидный димер, активный без лиганда [3], удалось пронаблюдать новое состояние ТМД TrkA, скорее всего соответствующее активному состоянию рецептора; ингибирующая же мутация не оказывает существенного влияния на структуру белка. Все полученные данные говорят в пользу прямого связывания примембранного региона TrkA с нейротрофином, а сравнение структур трансмембранных доменов TrkA и TrkB позволяет предположить, что такой механизм может быть характерен и для других Trk.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 22-14-00130.

Литература

1. Casarotto P.C., Girysh M., Fred S.M., Kovaleva V., Moliner R., Enkavi G., Biojone C., Cannarozzo C., Sahu M.P., Kaurinkoski K., Brunello C.A., Steinzeig A., Winkel F., Patil S., Vestring S., Serchov T., Diniz C.R.A.F., Laukkanen L., Cardon I., Antila H., Rog T., Piepponen T.P., Bramham C.R., Normann C., Lauri S.E., Saarma M., Vattulainen I., Castrén E. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. 2021. Cell 184, 1299-1313.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.034>
2. Franco M.L., Nadezhdin K.D., Goncharuk S.A., Mineev K.S., Arseniev A.S., Vilar M., Structural basis of the transmembrane domain dimerization and rotation in the activation mechanism of the TRKA receptor by nerve growth factor. J. Biol. Chem. 2020. 295, 275–286. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011312>
3. Moncrieff J., Cooper R.E., Stockmann T., Amendola S., Hengartner M.P., Horowitz M.A., The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence. Mol. Psychiatry. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01661-0>

Разработка биотехнологических способов контроля патогенов *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

А.Д. Токмакова^{1,2}, А.А. Лукьянова², К.А. Мирошников²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (Cff) – грамположительная, аэробная, подвижная бактерия, вызывающая ржаво-бурую пятнистость листьев сои и фасоли. Основной мишенью данного патогена является сосудистая система растения. Из-за активного роста биомассы бактерий в сосудах ксилемы нарушается циркуляция жидкости в растениях, в результате чего корни и листья темнеют, приобретают коричневый цвет, а само растение начинает погибать [1].

Решение проблемы бактериоза бобовых должно носить комплексный характер и может включать целый спектр биотехнологических подходов, включающий как разработку методов диагностики, так и методов непосредственной борьбы с патогеном. Представленная работа была сфокусирована на изучении возможности использования бактериофагов и фаговых литических белков для борьбы с ржаво-бурыми пятнистостями. На данный момент в растениеводстве это перспективный метод биологической защиты, и может быть эффективным и безопасным решением для профилактики и лечения ржаво-бурыми пятнистостями.

Ранее авторами был разработан и опубликован ПЦР-диагностический метод для родоспецифической детекции *Curtobacterium* spp. [2], созданный на базе консервативного для данного рода участка гена 23S рРНК. Диагностический метод позволяет как детектировать наличие патогена в растительном материале, так и идентифицировать выделенные штаммы. Отобранные с помощью этой системы штаммы вошли в рабочую коллекцию лаборатории молекулярной биоинженерии и были использованы для поиска бактериофагов.

Целью работы была разработка биотехнологических способов борьбы с патогеном *Cff*. Для этого были поставлены задачи: исследования биохимических особенностей выделенных штаммов коллекции, выделение бактериофагов из объектов окружающей среды с помощью накопительных культур штаммов *Cff* и исследование выделенных литических бактериофагов и их цитотоксических белков как потенциальных средств борьбы с ржаво-бурыми пятнистостями.

В результате биохимической, генетической и фитопатологической характеристики выделенных изолятов *Curtobacterium* spp. было отобрано 30 штаммов для постановки накопительных культур. В работе было изучено 30 проб земли и сточных вод из разных уголков России (включая Московскую, Калужскую, Пензенскую, Белгородскую и Курскую области, а также республику Карелия). В результате было выделено 7 фагов, инфицирующих *Cff*. Для первичной оценки биотехнологического потенциала и изучения разнообразия выделенных бактериофагов была проведена оценка их инфекционного спектра. Для большинства изолятов спектр был идентичен за исключением бактериофага Tim-91, взятого в дальнейшую работу. Полногеномное секвенирование одного из выделенных фагов [3] и последовательности эндוליзина gp12 всех остальных показало их таксономическую близость. Все выделенные фаги относятся к семейству *Salasmaviridae* и по видимому, формируют новое подсемейство [3,4].

Дальнейшие исследования были проведены с бактериофагом Tim-91. В работе был изучен его латентный период, скорость адсорбции, определена минимальная множественность инфекции, необходимая, чтобы вызвать полный лизис бактериальной культуры-хозяина. Также рассмотрено влияние pH, NaCl и различной температуры на жизнеспособность фага (рис. 1).

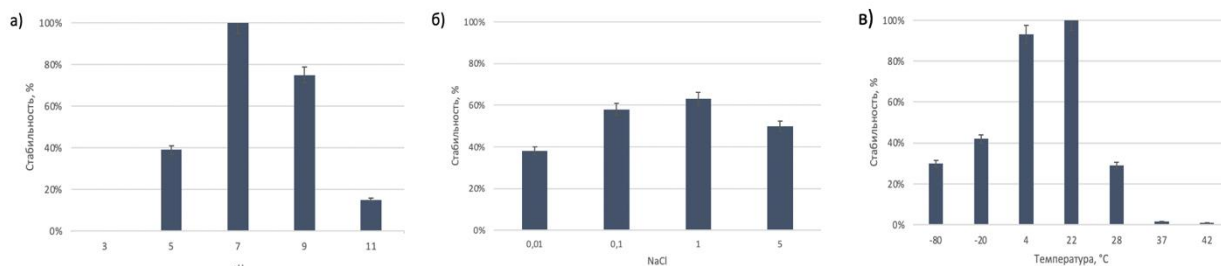


Рисунок 1. Влияние pH (а), NaCl (б) и температуры (в) на жизнеспособность бактериофага Tim-91. Результаты по прошествии 24 ч.

Кроме того, в вектор pTSL нами были клонированы гены, кодирующие белки эндוליзина (gp11) и структурной пептидогликан-гидролазы (gp12) фага Tim-91, которые обеспечивают проникновение ДНК фага в бактериальную клетку и ее дальнейший лизис. Полученные конструкции

были трансформированы в клетки *E. coli* BL21(DE3) и проведена оптимизация условий экспрессии. Полученные рекомбинантные белки проявляли бактериолитическую активность на газонах культур *Curtobacterium* spp..

Бактериофаг Tim-91 может стать компонентом препарата для биоконтроля патогена *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Для обработки семян сои могут использоваться как суспензии фаговых частиц, так и рекомбинантные цитолитические белки данного фага.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ №21-16-00047.

Литература

1. *Puia J.D. et al.* Protocol for detecting *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in the leaves of infected bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) // *Acta Scientiarum. Agronomy*. 2021. V. 43.
2. *Evseev P. et al.* *Curtobacterium* spp. and *Curtobacterium flaccumfaciens*: Phylogeny, genomics-based taxonomy, pathogenicity, and diagnostics // *Current Issues in Molecular Biology*. 2022. V. 44(2). P. 889-927.
3. *Tarakanov R.I. et al.* Ayka, a Novel *Curtobacterium* Bacteriophage, Provides Protection against Soybean Bacterial Wilt and Tan Spot // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23(18). P. 10913.
4. *Alanin K.W.S. et al.* Four novel *Curtobacterium* phages isolated from environmental samples // *Archives of Virology*. 2023. V. 168(3). P. 1-7.

УДК 620.3

Сравнение двухстадийной адресной доставки на примере пары барназа*барстар с одностадийной доставкой наночастиц *in vitro* и *in vivo*

Е.Н. Комедчикова^{1,2}, В.О. Шипунова^{1,2,3}, С.М. Деев²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

³Научно-технологический университет «Сириус»

Клиническое применение адресных наночастиц для терапии и диагностики раковых заболеваний ограничено целым рядом факторов, несмотря на впечатляющие результаты *in vitro*. Одной из причин может быть недостаточная эффективность эффекта повышенной проницаемости и задержки (EPR effect), за счёт которого наночастицы поступают в опухоль, а потому на данный момент разрабатываются подходы, позволяющие преодолеть эти ограничения [1]. Одним из перспективных методов является двухстадийная доставка, которая предполагает последовательное введение сначала нетоксичного компонента, распознающего раковые клетки, с дальнейшим введением в меньшей дозе терапевтического компонента [2, 3].

В данной работе мы продемонстрировали преимущество использования двухстадийной адресной доставки наночастиц на основе пары барназа*барстар по сравнению с одностадийной адресной доставкой для лечения и терапии раковых заболеваний *in vitro* и *in vivo*. А именно, каркасный белок DARPIn9_29, распознающий рецептор HER2, был генетически слит с барстаром, и данный гибридный белок (DARPIn9_29-барстар) являлся нетоксичным компонентом, распознающим раковые клетки. Поверхность наночастиц была химически модифицирована барназой, и данные наночастицы были использованы в качестве терапевтического компонента. Распознавание барназой на поверхности наночастиц барстара в составе гибридного белка приводило к самосборке супрамолекулярной конструкции DARPIn9_29-барстар*барназа-наночастицы на поверхности клеток. Наночастицы, химически модифицированные каркасным белком DARPIn9_29 были использованы для одностадийной доставки.

В данной работе:

Были синтезированы и охарактеризованы полимерные наночастицы на основе поли-лактид-ко-гликолида, в состав которых был включён терапевтический препарат доксорубин и флуоресцентный краситель нильский голубой

Методом проточной цитометрии было продемонстрировано эффективное двухстадийное мечение SK-BR-3 клеток, сверхэкспрессирующих рецептор HER2

Методом МТТ-тест была продемонстрирована цитотоксичность наночастиц для SK-BR-3 клеток при двухстадийной доставке и показано уменьшение более чем в 100 раз IC50 по сравнению с одностадийной доставкой

Были продемонстрированы терапевтические свойства наночастиц *in vivo* на мышах BALB/c с солидной опухолью молочной железы EMT-HER2 (EMT6/P клетки с внесённым лентивирусом HER2 рецептором) и показано более эффективное ингибирование роста опухоли при двухстадийной доставке

Таким образом, предложенная стратегия двухстадийной адресной доставки наночастиц превосходит применяемую на данный момент технологию одностадийной доставки наночастиц и является важным шагом в развитии персонализированной медицины и онкотерапии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ №22-73-10141.

Литература

- 1 *Danhier F.* To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J Control Release.* 2016 Dec 28; 244(Pt A):108-121.
- 2 *Shramova E.I. et al.* Barnase*Barstar-guided two-step targeting approach for drug delivery to tumor cells *in vivo.* *J Control Release* 2021, 2021 Dec 10; 340:200-208.
- 3 *Su X. et al.* Synergistic antitumor activity from two-stage delivery of targeted toxins and endosome-disrupting nanoparticles. *Biomacromolecules.* 2013 Apr 8;14(4):1093-102.

УДК 577.322.53

Получение и исследование методами криоэлектронной микроскопии комплексов $\alpha 7$ никотинового ацетилхолинового рецептора с лигандами

И.Д. Кукушкин¹, М.А. Шулепко^{2,3}, М.Л. Бычков³, Ю. Чесноков⁴, К. Плохих⁴, Е.Н. Люкманова^{2,3}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Шэньчжэньский МГУ-ППИ Университет

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

⁴НИЦ "Курчатовский институт"

Никотиновые рецепторы ацетилхолина типа альфа 7 ($\alpha 7$ -nAChR) являются пентамерными лиганд-зависимыми ионными каналами, которые экспрессируются в мозге и в некоторых ненейронных клетках, например, в селезенке и лимфатических узлах [1]. Рецепторы данного типа играют важную роль в нейрональной пластичности головного мозга, тем самым напрямую воздействуя на процессы мышления, памяти и поведения животных и человека [1]. Многие психические и неврологические заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, Болезнь Паркинсона, эпилепсия, шизофрения связаны с нарушениями в работе ионных каналов, в том числе и $\alpha 7$ -nAChR [2]. Было также показано, что $\alpha 7$ -nAChR стимулируют пролиферацию различных раковых клеток [3]. Перспективным методом лечения заболеваний, связанных с $\alpha 7$ -nAChR, может быть создание лекарств направленного действия, имитирующих свойства природных лигандов рецептора (агонистов или антагонистов), к которым относятся белки семейства Lуб/uPAR [4], для успешного рационального дизайна на их основе новых лекарственных препаратов необходимы знания о взаимодействии $\alpha 7$ -nAChR с его лигандами на атомном уровне. На данный момент известна пространственная структура $\alpha 7$ -nAChR в комплексе с низкомолекулярными модуляторами и селективным ингибитором α -бунгаротоксином [5], однако, нет данных о структуре рецептора с другими лигандами, например, трехпетельными белками человека. Получение структур комплексов $\alpha 7$ -nAChR с различными белками-лигандами является важной задачей структурной биологии и фармакологии.

Целью данной работы была разработка системы очистки и стабилизации $\alpha 7$ -nAChR из клеток НЕК293F и дальнейшее исследование полученного препарата с помощью криоэлектронной микроскопии в комплексе с лигандами и без. Для лучшей стабильности рецептора для экспрессии была использована конструкция с заменой нестабильной внутриклеточной петли $\alpha 7$ -nAChR на белок bRIL. Для последующей аффинной очистки был предусмотрен стрептавидиновый таг на C-конце (в дальнейшем $\alpha 7$ -nAChR-bRIL) [5].

В рамках данной работы разработан протокол высокоэффективной очистки рецептора на стрептактиновой смоле и стабилизацией рецептора в смеси DDM/lipids/cholesterol (рис. 1А). Дальнейшая очистка рецептора с помощью гель-фильтрации в липидхолестерин-детергентной смеси позволила изолировать фракцию рецептора в пентамерной форме (рис. 1Б). Гомогенность полученного препарата проверяли при помощи Вестерн-блоттинга с антителами на стрептавидиновый таг (рис. 1В). Полученный препарат рецептора был сконцентрирован, нанесен на медные сетки и исследован методом криоэлектронной микроскопии. Полученные изображения были классифицированы и в дальнейшем использованы для реконструкции пространственной структуры рецептора с ацетилхолином (рис. 1Г) и комплекса рецептора с селективным лигандом – α -бунгаротоксином и

ацетилхолином (Рис. 1Д). Далее часть препарата рецептора удалось встроить в липид-белковые нанодиски на основе белка MSP2N2 для получения более стабильного препарата рецептора со структурой более высокого разрешения (рис. 1Е).

Таким образом, нами был разработан протокол получения, выделения и очистки $\alpha 7$ -nAChR-bRIL путем аффинной экстракции из клеток HEK293F, проведено препаративное выделение рецептора, подобраны условия стабилизации рецептора в мицеллах и липид-белковых нанодисках, показана возможность исследования полученного рецептора методом криоэлектронной микроскопии. Также нами получены криоэлектронные изображения рецептора и реконструирована пространственная структура рецептора с ацетилхолином и рецептора в комплексе с α -бунгаротоксином и ацетилхолином с разрешением около 10 Å. Для внеклеточного домена рецептора, встроенного в нанодиски удалось получить структуру с разрешением 2.4 Å, однако, структуру трансмембранного и внутриклеточного домена разрешить пока не удалось из-за его высокой подвижности.

Работа поддержана грантом РФФ № 19-74-20163.

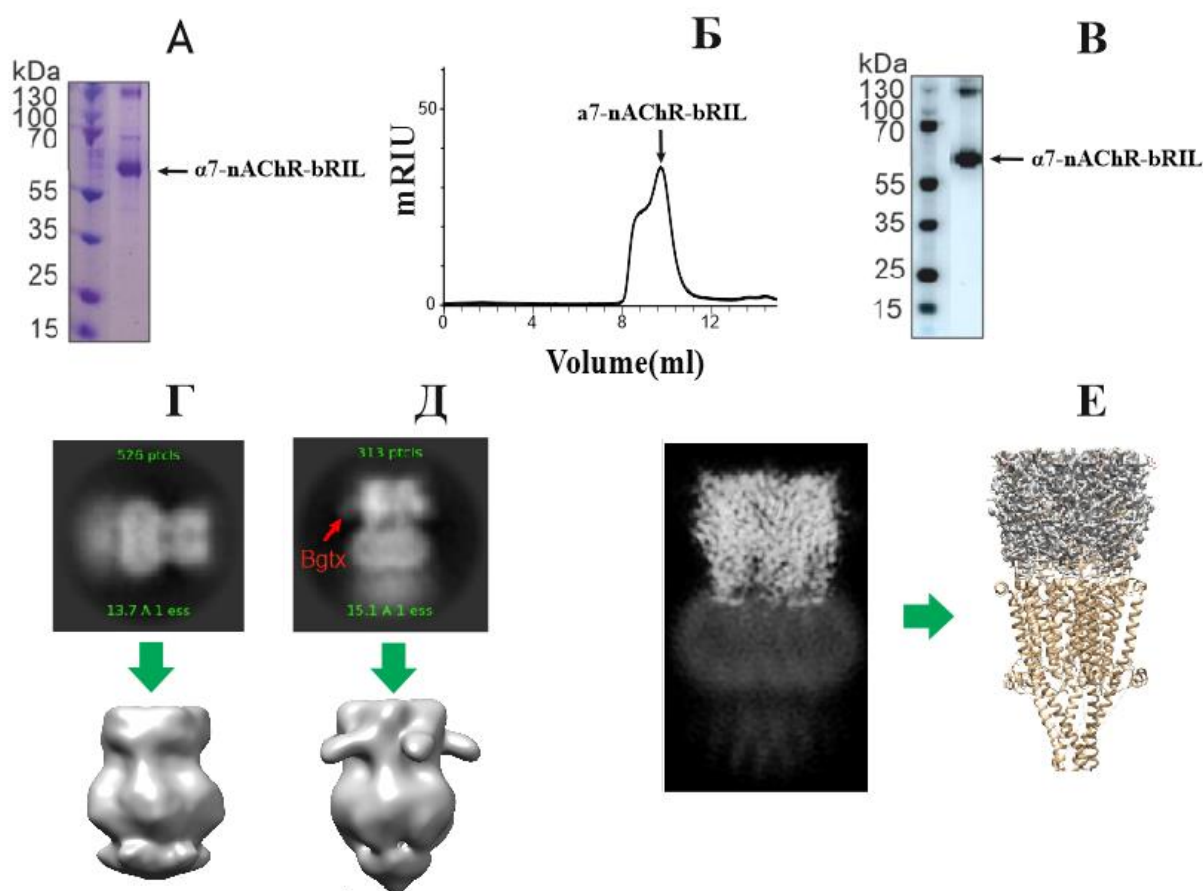


Рисунок 1. Выделение $\alpha 7$ -nAChR-bRIL из клеток HEK293F и дальнейшие структурные исследования рецептора. А. SDS-электрофорез в ПААГ рецептора, очищенного на стрептактиновой смоле. Б. Очистка $\alpha 7$ -nAChR-bRIL методом гель-фильтрации в липидхолестерин-детергентной смеси. В. Анализ препарата $\alpha 7$ -nAChR-bRIL посредством Вестерн-блоттинга (антитела на Strep-таг). Г. Криоэлектронное изображение и объемная реконструкция $\alpha 7$ -nAChR-bRIL/ACh в смеси DDM/lipids/cholesterol. Д. Криоэлектронное изображение и объемная реконструкция $\alpha 7$ -nAChR-bRIL/Bgtx/ACh в смеси DDM/lipids/cholesterol. Е. Криоэлектронное изображение и объемная реконструкция внеклеточного домена $\alpha 7$ -nAChR-bRIL/ACh в липид-белковых нанодисках на основе MSP2N2 (в электронную плотность вписана структура открытого канала).

Литература

1. Kulbatskii D.S., Bychkov M.L., Lyukmanova E.N. Human Nicotinic Acetylcholine Receptors: Part I. Structure, Function, and Role in Neuromuscular Transmission and CNS Functioning // Russ. J. Bioorganic Chem. 2018. Vol. 44, № 6. P. 595–607.

2. Koukoulis F., Maskos U. The multiple roles of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in modulating glutamatergic systems in the normal and diseased nervous system // *Biochem. Pharmacol.* 2015. Vol. 97, № 4. P. 378–387.
3. Dasgupta P., Rizwani W., Pillai S., Kinkade R., Kovacs M., Rastogi S., Banerjee S., Carless M., Kim E., Coppola D., Haura E., Chellappan S. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2009 Jan 1;124(1):36-45.
4. Fu X.W., Song P.F., Spindel E.R. Role of Lynx1 and related Ly6 proteins as modulators of cholinergic signaling in normal and neoplastic bronchial epithelium // *Int. Immunopharmacol.* 2015. Vol. 29, № 1. P. 93–98.
5. Noviello C.M., Gharpure A., Mukhtasimova N., Cabuco R., Baxter L., Borek D., Sine S.M., Hibbs R.E. Structure and gating mechanism of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Cell.* 2021 Apr 15;184(8).

УДК 577

***In silico* target prediction for antibacterial free fatty acids extracted from *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) larvae fat**

J.O. Okunola¹, E.M. Marusich¹, S.V. Leonov^{1,2}

¹School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology

²Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences

The search for new candidate compounds that can serve as antibiotics is as relevant as ever today.

The ability of *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) larvae (BSFL) to convert organic waste into high-value biomass has been well documented, accumulating up to 50% protein and 35% fats on a dry matter basis [3]. Because of their nutritional value, BSFL are widely used in feed for livestock. However, free fatty acids from BSFL have been shown to have antimicrobial properties. Previously in our laboratory, we reported the antimicrobial properties of free fatty acids from BSFL against phytopathogens [1] and MDR pathogenic fish bacteria *Aeromonas spp.* [2].

In this research, we showed the antimicrobial activity of fatty acids extracted from Black Soldier Fly larvae fat against human pathogenic bacteria - *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*, then we employed molecular docking to predict the target(s) and suggest possible mechanism of action of these antimicrobial fatty acids, *in silico*.

To achieve this aim, fat samples from BSF larvae were collected and sequentially extracted according to the previously established extraction protocol [2]. The concentration of the free fatty acids and the extraction yield were estimated appropriately. To evaluate the antimicrobial potentials of the extracts on *S. aureus* and *K. pneumoniae*, disk diffusion assay method was used and the Inhibition Zone Diameters (IZDs) were determined. To identify the chemical composition of the extracts, Gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) analysis was carried out.

For the *in silico* studies, the 3-D structures of our compounds (ligands) were retrieved from the PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), while the structures of possible bacterial targets (receptors) were retrieved from RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). All subsequent computational operations were carried out in Maestro 11 package (Schrodinger Suites, 2018). The ligands and receptors were prepared using LigPrep and Protein Preparation Wizard, respectively. The active sites of the receptors were predicted using Site Map and Glide Grid programs. The molecular docking of the prepared ligands in the active sites of the receptors was performed using Glide on the same Maestro package.

The disk diffusion assay showed that our extract possesses potent antimicrobial activity against both *S. aureus* (Gram +ve) and *K. pneumoniae* (Gram -ve) with IZDs of 18.25 ± 0.00 mm and 18.10 ± 0.012 mm, respectively. The GC-MS analysis identified 33 compounds with similarity index $\geq 70\%$ to compounds in NIST library. They include saturated fatty acids (such as dodecanoic and hexadecenoic acids), unsaturated fatty acids (such as cis-oleic and linoleic acids), and some fatty acid derivatives (such as monolaurin).

Fifteen bacterial proteins which are targets for approved antibiotics were selected for our *in silico* analysis. They fall under four groups of antibacterial target classes: proteins involved in cell wall synthesis, proteins involved folate synthesis, those involved in nucleic acid synthesis, and those involved in membrane transport. From our molecular docking analyses, Eicosanoic acid, Octadecanoic acid, Linoleic acid (shown in the active site of MurB in fig. 1), and cis-Oleic acid showed very good binding affinities with MurB, which is an essential enzyme in cell wall synthesis. This binding, that could inhibit this enzyme, leads to discontinuation of the peptidoglycan wall formation, consequently leading to cell lysis. The same compounds also showed very good affinities with dihydrofolate reductase and FabI, involved in folate and fatty acid synthesis, respectively. Compounds from our extract showed poor or low affinity for protein targets involved in nucleic acid synthesis and transport proteins, including efflux pumps.

These results further confirms that fatty acids present in our extracts from Black Soldier Fly larvae fat samples are capable of interacting with vital bacterial macromolecules. Our results are also in line with previously published reports that fatty acids disrupt the integrity of bacterial cell wall and membrane. Our results show possible target molecules involved in this process. Lastly, we conclude that the antibacterial action of our extract could have a multi-target character, which makes it difficult for bacteria to develop resistance against it.

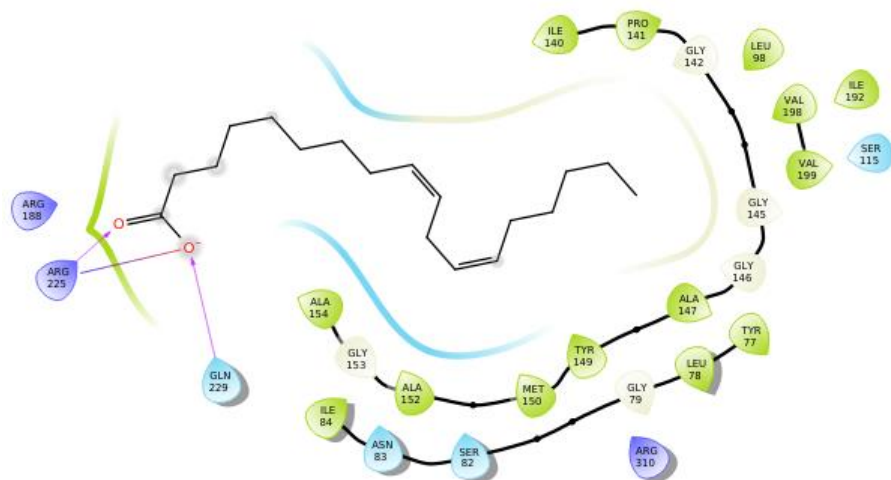


Figure 1. A representative 2D-Interaction of Linoleic acid at the binding site of MurB. The carboxyl group of the fatty acid binds with the ARG225 and GLN229 residues of protein, MurB.

References

1. Marusich E., Mohamed H., Afanasev Y., Leonov S. Fatty Acids from *Hermetia illucens* Larvae Fat Inhibit the Proliferation and Growth of Actual Phytopathogens. *Microorganisms*, (2020). 8(9), 1423.
2. Mohamed H., Marusich E., Afanasev Y., Leonov S. Fatty Acids-Enriched Fractions of *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) Larvae Fat Can Combat MDR Pathogenic Fish Bacteria *Aeromonas* spp. *International Journal of Molecular Sciences* 22, (2021) no. 16: 8829.
3. Shumo, M., et al. The nutritive value of black soldier fly larvae reared on common organic waste streams in Kenya. (2019). *Scientific Reports* 9, 10110. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46603-z>

УДК 620.187.3

Синтез и характеристика серебряных наночастиц, обладающих свойством локализованного поверхностного плазмонного резонанса

Т.В. Рожникова, В.О. Шипунова

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Несмотря на стремительное развитие медицины, онкологические заболевания остаются одной из главных причин смертности в наши дни и их всё так же трудно диагностировать на ранних стадиях. Не менее сложной задачей является лечение злокачественных опухолей на поздних стадиях. Стандартные методы лечения не всегда дают ожидаемый эффект и имеют множество побочных действий.

Серебряные наночастицы благодаря их терапевтическим свойствам имеют большой потенциал для применения в онкотерапии. Они обладают уникальными физико-химическими свойствами.

Особый интерес представляют исключительные оптические свойства серебряных наноструктур, заключающиеся во взаимодействии со светом, в результате которого возникают коллективные когерентные колебания их свободных электронов, так называемый локализованный поверхностный плазмонный резонанс [1]. Это уникальное свойство наночастиц имеет огромное значения для применения наночастиц серебра в целях онкотерапии, поскольку колебания свободных электронов приводят либо к радиационному распаду с сильным рассеянием видимого света, что может быть применено для визуализации и диагностики; либо к преобразованию энергии фотонов в тепловую энергию, что возможно использовать для терапии [2].

Поверхностный плазмонный резонанс наночастиц серебра зависит от размера и формы частиц. Изменение этих параметров может быть использовано для настройки плазмонного пика наночастиц. Для этих целей были исследованы методы синтеза сферических наночастиц серебра, позволяющие осуществлять контроль размера наночастиц.

Размеры и форма химически синтезированных сферических наночастиц серебра были оценены путём анализа серий изображений, сделанных на сканирующем электронном микроскопе. Также были проанализированы фототермические свойства частиц. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения серебряных наночастиц для гипетермии опухолей.

Проведённые исследования позволили установить, что для контроля размера наночастиц серебра решающее значение имеет не только концентрация реагентов, но и pH реакционной среды.

Работа поддержана грантом РФФ №22-73-10141.

Литература

1. *Belova M.M. et al.* "Green" Synthesis of Cytotoxic Silver Nanoparticles Based on Secondary Metabolites of *Lavandula Angustifolia* Mill // *Acta Naturae*. – 2019. – Т. 11 – №. 2. – P. 47-53.
2. *Shipunova V.O. et al.* Photothermal Therapy with HER2-Targeted Silver Nanoparticles Leading to Cancer Remission // *Pharmaceutics*. – 2022. – Т. 14 – №. 5.

УДК 577.112

Получение гемсодержащих белков нейроглобина и цитохрома *c* с мутациями в предполагаемом интерфейсе их взаимодействия

М.А. Семенова¹, О.М. Смирнова¹, А.А. Игнатова¹, Э.В. Бочаров¹, Д.А. Долгих^{1,2}, Р.В. Черткова¹

¹Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

²Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

Нейроглобин (Ngb) – гемсодержащий белок из семейства глобинов филогенетически древнего происхождения, для которого была показана нейропротекторная функция [1]. Существует гипотеза, согласно которой эта функция осуществляется путем взаимодействия Ngb с митохондриальным цитохромом *c* (Cyt *c*) в результате которого предотвращается запуск апоптоза по Cyt *c*-зависимому пути [2]. При этом структура комплекса Ngb с Cyt *c* не известна, интерфейс их взаимодействия не установлен. Методом молекулярного докинга получено несколько моделей комплекса, которые на данный момент не имеют полного экспериментального подтверждения [3,4]. В связи с этим представляется актуальным получение вариантов Ngb и Cyt *c* с мутациями в предполагаемом интерфейсе их взаимодействия. Это позволит изучить вклад отдельных аминокислотных остатков в образование комплекса между Ngb и Cyt *c* и в перспективе перейти к рациональному дизайну новых терапевтических средств для ингибирования гибели нейрональных клеток в условиях ишемии и гипоксий различного генеза.

Нами разработана и оптимизирована эффективная система биосинтеза рекомбинантного Ngb человека: сконструирован плазмидный вектор pET-17b-Ngb с геном Ngb, получен бактериальный штамм-продуцент *E. coli* SHuffleT7-Ngb, подобраны условия выделения и очистки белка в водорастворимой форме. Гомогенность белка была подтверждена с помощью гель-электрофоретического анализа и спектрофотометрически в УФ-видимой области. Получены характерные спектры поглощения окисленной и восстановленной форм Ngb с максимумами в области Core при 412 и 424 нм соответственно, что подтверждает наличие правильно встроенного в белковую молекулу гемопорфирина. На спектре восстановленного Ngb также выделяется два пика в области Q-полос (528 и 558 нм), которые характерны для низкоспинового гексакоординированного гемового железа [5]. Согласно данным спектроскопии КД и ЯМР, во вторичной структуре Ngb преобладает α -спираль, что соответствует литературным данным [5,6]. Cyt *c* получали с помощью, разработанной ранее в нашей лаборатории экспрессионной системы pVP(CYC1/CYC3) [7].

Проведен сравнительный анализ одномерного ¹H-ЯМР-спектра эквимольной смеси Ngb/Cyt *c* и суммы ¹H-ЯМР-спектров Ngb и Cyt *c*, накопленных по отдельности. Был выявлен сдвиг ряда ¹H-ЯМР-сигналов в смеси белков, что указывает на то, что рекомбинантные белки Ngb и Cyt *c* образуют комплекс при смешивании в растворе.

На основе моделей комплекса Ngb-Cyt *c* [3,4] сконструированы панели вариантов Ngb (с мутациями E60K, E87K, K67E, K95E, E60K/E87K) и Cyt *c* (с мутациями K25E, K72E и K25E/K72E) с заменами остатков в предполагаемом интерфейсе их взаимодействия. Эти варианты мутаций предполагают изменение заряда аминокислотного остатка на противоположный, и, следовательно,

способны влиять на электростатические взаимодействия между белковыми молекулами. Методом сайт-направленного мутагенеза мутации вносили в гены *Ngb* и *Cyt c* в составе плазмидных векторов pET-17b-*Ngb* и pBP(CYC1/CYC3) соответственно.

Мутантные варианты *Ngb* и *Cyt c* получали с использованием экспрессионных систем, разработанных для белков дикого типа, с небольшими модификациями для отдельных мутантов. Спектры поглощения мутантных вариантов *Ngb* в УФ-видимой области были схожи со спектром *Ngb* дикого типа. Однако для *Ngb* с мутациями E60K и K95E были зарегистрированы сдвиги в области *Soret* в красную область на 2 и 3 нм в окисленной форме, и на 1 нм в синюю область в восстановленной форме. Небольшой сдвиг в синюю область может свидетельствовать об изменении спина гемового железа в сторону более высокоспинового состояния, тогда как сдвиг в красную область может быть обусловлен изменением электростатического поля вблизи гема [8]. На спектре восстановленных *Ngb* E60K и E60K/E87K также присутствует выраженный пик с максимумом при 582 нм в области Q-полос, который слабо выделяется на спектре дикого типа и других мутантных вариантов *Ngb*. Этот пик считается характерным для высокоспинового гексакоординированного гемового железа [5]. Спектры поглощения мутантных вариантов *Cyt c* в УФ-видимой области полностью совпадают со спектрами белка дикого типа в восстановленном и окисленном состоянии, что говорит об отсутствии существенных отличий в состоянии гемопорфирина белка при внесении данных мутаций.

Вторичная структура мутантных вариантов *Ngb*, рассчитанная по спектрам КД, соответствует таковой для *Ngb* дикого типа ($\pm 2\%$), за исключением *Ngb* K67E. Для него показано повышение содержания α -спирали на 5% одновременно со снижением содержания β -поворота до 0,1%, на основании чего можно предположить, что в структуре данного мутантного варианта происходит реорганизация β -поворота в α -спираль.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00985).

Литература

4. Brittain T., Skommer J., Raychaudhuri S., Birch N. An Antiapoptotic Neuroprotective Role for Neuroglobin // *Int. J. Mol. Sci.* 2010. V. 11. P. 2306–2321.
5. Fago A., Mathews A.J., Brittain T. A Role for Neuroglobin: Resetting the Trigger Level for Apoptosis in Neuronal and Retinal Cells // *IUBMB Life.* 2008. V. 60. P. 398–401.
6. Bonding S.H., Henty K., Dingley A.J., Brittain T. The binding of cytochrome c to neuroglobin: A docking and surface plasmon resonance study // *Int. J. Biol. Macromol.* 2008. V. 43. P. 295–299.
7. Tejero J. Negative surface charges in neuroglobin modulate the interaction with cytochrome c // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 523. P. 567–572.
8. Andre E., Derrien V., Sebban P., Assir N., E. Lescop, S. Bernad. Impact of A90P, F106L and H64V mutations on neuroglobin stability and ligand binding kinetics // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2019. V. 24. P. 39–52.
9. Guimaraes B.G., Hamdane D., Lechauve C., Marden M.C., Golinelli-Pimpaneau B. The crystal structure of wild-type human brain neuroglobin reveals flexibility of the disulfide bond that regulates oxygen affinity // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2014. V. 70. P. 1005–1014.
10. Chertkova R.V., Sharonov G.V., Feofanov A.V., Bocharova O.V., Latypov R.F., Chernyak B.V., Arseniev A.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Proapoptotic activity of cytochrome c in living cells: Effect of K72 substitutions and species differences // *Mol. Cell. Biochem.* 2008. V. 314. P. 85–93.
11. Skommer J., Helbo S., Henty K., Brittain T. Ligand binding, reactivity and biological activity of a distal pocket mutant of neuroglobin // *Int. J. Biol. Macromol.* 2012. V. 51. P. 284–290.

УДК 543.32/34

Разработка тест-систем для определения некоторых неорганических компонентов в природных пресноводных источниках

М.С. Медведев, Н.С. Егоров, С.В. Силкин, И.А. Попов

Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

Разрабатываются новые методы экспресс-анализа природных пресноводных источников на общее содержание соединений серы, сульфат, карбонат и гидрокарбонат ионов, предполагающих замену титриметрических [1] и хроматографических [2] методов на оптические, а также адаптация существующей методики определения ортофосфат ионов [3] к полевым условиям. Интерес к данной

теме вызван тем, что в настоящее время не существуют системы полноценного анализа природных вод в режиме реального времени, хотя в последние годы исследователями предложены новые подходы к автоматизации и экспресс-анализу водных объектов [4-6]. Существующие на данный момент методики количественного анализа природных вод хорошо реализуемы в лабораторных условиях [7], но малоприспособлены для быстрого и удобного определения в полевых условиях.

Для определения общего содержания серы, сульфат ионов, а также карбонат- и гидрокарбонат ионов в пробах природной воды нами предложены тест-системы с реакционным гидрогелем и нефелометрическим детектированием аналитического сигнала. Данные тест-системы дополняют друг друга и могут рассматриваться как единый аналитический комплекс.

Тест система для определения сульфат ионов представляет собой герметизированную мерную пробирку или виалу объемом 15 мл заполненную пятью миллилитрами 1%-го геля гидроксиэтилцеллюлозы, приготовленном на 10%-м растворе хлорида бария и наслоенной сверху концентрированной соляной кислоты в объеме 200 мкл. Для проведения анализа требуется 10,0 мл пробы исследуемой воды, которую вводят с помощью фильтр-шприца. Мешающие данному определению карбонат и гидрокарбонат ионы удаляют нагреванием пробирки. В полевых условиях это можно осуществить, например, с помощью аккумуляторного строительного фена. Содержание сульфат ионов в пробе воды определяют исходя из показателя мутности в единицах NTU полученной мелкодисперсной суспензии. Предложенная методика позволяет количественно обнаруживать ионы SO_4^{2-} в пробах природной воды до 2 мг/л.

Подобная тест-система была предложена для определения общего содержания серы, но дополнительно содержащая фиксатор гидросульфид ионов и окислитель. В качестве фиксатора гидросульфид ионов был предложен 0,1 М раствор хлорида меди(II), 100 мкл которого напыляли на стенки мерной пробирки, служившей приемником пробы. В роли окислителя использовали 3%-й раствор пероксида водорода, точный объем которого помещали в герметизируемый шприц. Такой подход позволяет сначала связать в нерастворимую форму гидросульфид ионы, а затем перевести все серосодержащие формы в сульфат ионы с помощью окислителя в кислой среде.

Для количественного определения гидрокарбонат и карбонат ионов были предложены аналогичные тест-системы. В отличие от хорошо известных в настоящее время методов количественного определения гидрокарбонат и карбонат ионов [1], предложенная нами методика основана на реакции осаждения карбонат ионов ионами Ba^{2+} в щелочной среде с последующим измерением мутности полученной суспензии. При таком подходе неминуемо совместное осаждение большинства катионов d-металлов, а также сульфат- и ортофосфат- ионов. Для подавления осаждения катионов d-металлов мы использовали триэтанолламин (ТЕА) в качестве маскирующего агента, который позволяет связывать в комплексные соединения многие d-металлы в щелочной среде [8]. Оптимальное значение pH для данного количественного определения карбонат ионов составило 10,1-10,2, которое достигается 0,1 М раствором ТЕА. Такая концентрация ТЕА для катионов d-металлы оказывается превышенной как минимум на три порядка, тем самым обеспечивая полноту комплексообразования.

В анализе измеряют интегральный показатель мутности мелкодисперсной суспензии, а затем вычитают аналогичную величину, ранее полученную при определении содержания сульфат ионов в той же пробе, учитывая, таким образом, осаждение, связанное с мешающими SO_4^{2-} ионами. Содержание ортофосфат ионов в пресной природной воде, как правило, значительно ниже, чем содержание карбонат и гидрокарбонат ионов, что позволяет пренебречь их концентрацией при определении CO_3^{2-} ионов. Калибровочный график для определения содержания карбонат ионов оказался линейным в диапазоне 50-750 мг/л CO_3^{2-} ионов. Соотношение между ионными формами $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ определяли из кислотно-основного равновесия после измерения pH пробы воды.

Тест-система для определения содержания ортофосфат ионов основана на фотоколориметрическом измерении оптической плотности модебденовой сини. Описанные в литературе методики определения ортофосфат ионов в природной воде [3] предполагают приготовление нестабильного окрашивающего раствора непосредственно перед началом анализа, что не представляется возможным реализовать в полевых условиях с минимальными трудозатратами. Принципиальное отличие от описанной в литературе методики заключается в разделении реагентов окрашивающего раствора таким образом, чтобы часть смеси реагентов находилась в сухом виде, нанесенной на стенки мерной пробирки, в которую помещается анализируемая проба, а другая часть, которая не может быть использована в виде сухой смеси, как раствор с точно заданной концентрацией. Такой подход существенно продлевает срок хранения тест-системы, а также приводит к снижению массы аналитического комплекта, что весьма важно для переносных лабораторий. Для приготовления окрашивающего раствора достаточно вколоть раствор сернокислого молибдата аммония из шприца в

мерную пробирку с нанесенной на ее стенки смеси реагентов, а затем внести через фильтр-шприц 10,0 мл анализируемой пробы воды. Полученную таким образом молибденовую синь, переносят в кювету фотоколориметра и измеряют оптическую плотность при 882 нм. Согласно литературным источникам [3,7] молибденовая синь имеет несколько максимумов поглощения света, но в предложенной нами методике лишь при длине волны 882 нм наблюдается наилучшая линейность калибровочного графика при содержании ортофосфат ионов до 0,5 мг/л.

Предложенные нами тест-системы для полевого экспресс-анализа могут оказаться вполне пригодными для быстрого мониторинга природных пресноводных источников, особенно в тандеме с разрабатываемыми вычислительными средами [9]. Основными их преимуществами является простота методик определения, не требующая от пользователя квалификации в аналитической химии, высокая скорость анализа, малые объемы анализируемой пробы и портативность аналитического комплекта. Однако, отсутствие автоматизации данных тест-систем, а, следовательно, и невозможность осуществления мониторинга качества воды в режиме реального времени является их главным недостатком.

Литература

1. РД 52.24.493-2020. Массовая концентрация гидрокарбонатов и щёлочность природных вод. Методика измерений титриметрическим методом.
2. РД 52.18.572-96. Определение массовой концентрации хлорид-,сульфат-, нитрат-, нитрит-ионов в пробах питьевой воды и в пробах почв (водных вытяжек) методом ионной хроматографии. методика выполнения измерений.
3. ГОСТ 18309-2014. Вода. Методы определения фосфорсодержащих веществ.
4. *Arndt J. et al.* Making waves: Time for chemical surface water quality monitoring to catch up with its technical potential //Water Research. 2022. V. 213. P. 118-168.
5. *Sivaiah N. et al.* Internet of things (Iot) enabled water monitoring system //Iconic Res. Eng. J. 2018. V. 1. P. 40-43.
6. *Tomar P. et al.* Water Bodies mapping and monitoring using high-resolution satellite images //Sustainability, Agri, Food and Environmental Research. 2023. V. 11.
7. *Ноллет Л.М.Л, Де Гелдер Л.С.П.* Анализ воды. Справочник: пер с англ. 2-е изд. под ред. И.А. Васильевой, Б.Л. Пролетарской -СПб.: "Профессия". 2012. 920 с.
8. *Пятницкий И.В., Сухан В.В.* Маскирование и демаскирование в аналитической химии. - М: "Наука". 1990. 222с.
9. *Silkin S. V. et al.* Mineral composition modelling of natural surface water //International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 2021. P. 1-12.

УДК 620.3

Адресные магнитные наночастицы для механо-индуцированного уничтожения HER2-положительных раковых клеток

О.А. Колесникова^{1,2}, В.О. Шипунова^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт биоорганической химии им. Академикова М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН

Онкозаболевания являются серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире, занимая во многих странах 2 или 3 место по уровню смертности среди пациентов. Несмотря на активное развитие методов лечения рака, главным инструментом до сих пор остаются консервативные методы, в частности, хирургия, химиотерапия и лучевая терапия, имеющие множество побочных эффектов и поражающие не только раковые, но и здоровые клетки.

Для многих видов рака характерна гиперэкспрессия HER (human epidermal growth factor receptor)-2-рецептора, в частности, для рака молочной железы, яичников, желудка и др. HER2-положительные опухоли являются одними из самых агрессивных, обладая высоким уровнем метастазирования и зачастую устойчивостью к действию химиотерапии.

Эффективным решением вышеперечисленных проблем является создание и использование высокоспецифичных наноразмерных тераностических препаратов, сочетающих в себе диагностические и терапевтические свойства [1-3]. Конкурентным преимуществом магнитных наночастиц (МНЧ) по сравнению с другими наноразмерными агентами является низкая токсичность и

высокая биосовместимость. Кроме того, МНЧ обладают магнитным моментом, что может быть использовано для дистанционного управления с помощью магнитного поля в различных областях биомедицины.

Целью данной работы является получение наночастиц магнетита для механо-индуцированного уничтожения HER2-положительных опухолей. В данной работе были получены и охарактеризованы МНЧ с успешной модификацией поверхности HER2-распознающими молекулами, в частности, полноразмерным антителом Трастузумаб, а также другими молекулами: аффибоди $Z_{HER2:342}$ и DARPIn_G3. Полученные биоконъюгаты эффективно связывались с поверхностью HER2-положительных раковых клеток в отличие от контрольных клеток, что было подтверждено методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии.

Для дальнейшей работы был выбран конъюгат с аффибоди $Z_{HER2:342}$, обладающий наименьшей токсичностью по отношению к клеткам, а также высокой специфичностью связывания с HER2-положительными раковыми клетками. Поверхность полученных МНЧ дополнительно модифицировали ТАТ-пептидом, была показана улучшенная эффективность проникновения МНЧ внутрь раковых клеток, а также локализация полученных МНЧ в лизосомах и цитоплазме клеток, в отличие от других биоконъюгатов, преимущественно локализующихся в лизосомах.

Полученные комплексы МНЧ с аффибоди $Z_{HER2:342}$ использовались для механо-индуцированного уничтожения HER2-положительных раковых клеток при стационарном и импульсном воздействии магнитного поля, а также при использовании комбинированного облучения. Методом конфокальной микроскопии было показано эффективное разрушение лизосом, а также нарушение целостности цитоскелета раковых клеток при комбинированном воздействии магнитного поля. Полученные данные были подтверждены с помощью резазуринового метода при оценке выживаемости раковых клеток после облучения магнитным полем.

Дополнительно была показана эффективность использования паклитаксела для избирательного нарушения динамики микротрубочек, блокировки репарации цитоскелета для достижения более эффективной элиминации раковых клеток с использованием МНЧ.

В данный момент, полученные биоконъюгаты МНЧ исследуются на мышиных моделях, получены результаты эффективного лечения HER2-положительных опухолей *in vivo*, демонстрирующие снижение динамики роста опухолей при воздействии МНЧ и низкочастотного магнитного поля.

Таким образом, были получены адресные МНЧ, которые использовались для механо-индуцированного разрушения лизосом и цитоскелета HER2-положительных раковых клеток при дистанционном воздействии низкочастотного магнитного поля. Биоконъюгаты МНЧ с аффибоди $Z_{HER2:342}$ являются эффективной платформой для различных областей биомедицины, включающих воздействие на раковые клетки как *in vitro*, так и *in vivo*.

Исследование поддержано грантом РФФИ, проект 22-73-10141.

Литература

1. Nikitin M.P. Non-complementary strand commutation as a fundamental alternative for information processing by DNA and gene regulation // Nat Chem. 2023. 15(1):70-82.
2. Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I. Biocomputing based on particle disassembly // Nat Nanotechnol. 2014. 9(9):716-22.
3. Nikitin M.P., Zelepukin I.V., Shipunova V.O., Sokolov I.L., Deyev S.M., Nikitin P.I. Enhancement of the blood-circulation time and performance of nanomedicines via the forced clearance of erythrocytes // Nat Biomed Eng. 2020. 4(7):717-731.

Белковые наночастицы на основе инкапсулина как платформа направленной доставки терапевтических соединений к HER2-сверхэкспрессирующим раковым клеткам**А.С. Обозина^{1,2}, С.Д. Зверева¹, В.О. Шипунова¹**¹Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

На сегодняшний день отсутствуют препараты на основе адресных наночастиц, одобренные для применения в клинике. Одними из ключевых проблем, препятствующих внедрению таких тераностических адресных наноагентов в медицину, являются проблемы со стандартизацией их параметров и невозможности химического синтеза. С другой стороны, самособирающиеся белковые наночастицы, которые способны возникать спонтанно за счёт взаимодействий между белковыми субъединицами, лишены таких проблем. Нарботка таких белковых мономеров в бактериальных продуцентах или в системах бесклеточной экспрессии позволяет получить воспроизводимые образцы белковых наночастиц. Спонтанная самосборка белковых мономеров приводит к образованию симметричных, стабильных и высокоорганизованных наноструктур диаметром 10-150 нм. Самособирающиеся белковые наночастицы имеют и другие преимущества над наночастицами другой химической природы: возможность их модификации с помощью инструментов генной инженерии для придания дополнительных полезных свойств белку, их стандартизованная нарботка в бактериальных продуцентах или системах бесклеточной экспрессии и очистка с высоким выходом белка [1]. Принимая во внимание перечисленные выше свойства белковых наночастиц, можно заключить, что системы направленной доставки лекарственных соединений на основе самособирающихся белковых наночастиц, таких как инкапсулин, представляют собой перспективный инструмент для диагностики и терапии различных заболеваний, в том числе онкологических. Инкапсулин – белок, выделенный из термофильных бактерий *Thermotoga maritima* и способный к самосборке в наночастицы диаметром 25–50 нм [2]. Платформа для направленной доставки лекарств на основе инкапсулина характеризуется легкостью биотехнологического получения в бактериальных продуцентах или системах бесклеточной экспрессии, биоразлагаемостью и биосовместимостью.

Цель работы – получение генетически кодируемой двухэтапной системы направленной доставки на основе инкапсулина к раковым клеткам, характеризующимся повышенной экспрессией рецептора HER2. Двухстадийный подход к доставке лекарств заключается в следующем: 1) адресное нацеливание нетоксического компонента на раковые клетки; 2) адресное нацеливание инкапсулиновой системы доставки, загруженной терапевтическим соединением, на нетоксический компонент. Для этого были сконструированы следующие плазмиды: 1) плазида, содержащая под контролем T7 промотора ген для экспрессии генетически модифицированного инкапсулина; 2) плазида, содержащая под контролем T7 промотора генетически модифицированный ген белка Z_{HER2:342}, слитого с белком, способным специфически связываться с рекомбинантным инкапсулином.

Были оптимизированы условия очистки из бактериального лизата инкапсулиновых наночастиц, имеющих субмикронный размер, с использованием таких методов как ультрацентрифугирование в сахарозном градиенте и гель-фильтрация. Слитые белки, содержащие аффибоди и гистидиновый тэг, были очищены с помощью никель-аффинной хроматографии. В ходе экспериментов *in vitro* было показано, что слитые белки, содержащие аффибоди, специфично связываются с BT-474 (HER2-положительные раковые клетки) и не связываются с EMT6/P (HER2-отрицательные клетки). Полученная белковая система представляет собой перспективную платформу для создания средств тераностики онкозаболеваний, в том числе, характеризующихся сверхэкспрессией онкомаркера HER2.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 22-73-10141.

Литература

1. *Obozina A.S. et al. Genetically Encoded Self-Assembling Protein Nanoparticles for the Targeted Delivery In Vitro and In Vivo // Pharmaceutics. 2023. V. 15. P. 231.*
2. *LaFrance B.J., Cassidy-Amstutz C., Nichols R.J. et al. The encapsulin from *Thermotoga maritima* is a flavoprotein with a symmetry matched ferritin-like cargo protein // Sci Rep. 2021. V. 11. P. 22810.*

УДК 57.037

Особенности взаимодействия тиосульфатного тетранитрозильного комплекса железа с двумя формами гемоглобина

А.В. Марьина¹, О.В. Покидова², Н.А. Санина^{1,2,3}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

²Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН

³Научно-образовательный центр «Медицинская химия» Московского государственного областного университета

После открытия важнейшей роли монооксида азота (NO) как сигнальной молекулы в регуляции сердечно-сосудистой системы резко увеличилось количество исследований его функций в различных биологических системах. Используемые на данный момент лекарственные препараты, экзогенные доноры NO, имеют свои недостатки такие как развитие эффекта толерантности и необходимость дополнительной активации. Нитрозильные комплексы железа с функциональными серосодержащими лигандами (НКЖ) представляют большой интерес для изучения, так как имеют ряд преимуществ перед другими классами экзогенных доноров NO: наличие двух фармакологически активных фрагментов в структуре комплексов, самопроизвольная генерация NO в водных растворах, действие при низких концентрациях и т.д.

В данной работе рассмотрен биядерный анионный тетранитрозильный комплекс железа (ТНКЖ) с тиосульфатными лигандами [1]. Изучение его биологической активности показало, что данный комплекс обладает антиметастатической активностью к меланоме B16 и LL-карциноме [2], также ингибирует ферментативную активность Ca^{2+} -АТФазы, препятствуя образованию тромбов с последующей адгезией метастатических клеток к эндотелию капилляров [3].

В условиях метаболизма NO может взаимодействовать с гем-содержащими белками. В настоящей работе было исследовано взаимодействие ТНКЖ с двумя формами гемоглобина – дезоксигемоглобином (Hb) и метгемоглобином (metHb). Исследования проводились в анаэробных условиях с помощью метода УФ-Вид спектрофотометрии. Были получены спектры поглощения системы комплекса с белками и проведен анализ кинетических кривых накопления продукта, рассчитаны эффективные константы скорости реакций. Исследована NO-донорная активность ТНКЖ. Показано, что конечным продуктом при взаимодействии с Hb и metHb является нитрозогемоглобин HbNO. Установлено, что в присутствии гемоглобина комплекс медленнее донирует NO, что свидетельствует о его стабилизации на поверхности белка.

Работа выполнена по теме Государственного задания, № гос. регистрации № АААА-А19-119071890015-6.

Литература

1. Sanina N.A., Aldoshin S.M., Rudneva T.N. Synthesis, structure and solid-phase transformations of Fe nitrosyl complex $Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4] \cdot 4H_2O$ // Russ. J. Coord. Chem. 2005. V. 31. P. 301-306.
2. Санина Н.А. и др. Противоопухолевая активность нитрозильных комплексов железа – новых доноров оксида азота // Российский химический журнал. 2009. Т. LIII. № 1. С. 164-171.
3. Татьянаенко Л.В. и др. Влияние нитрозильных железо-серных комплексов на активность гидролаз // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43. № 9. С. 45-49.

УДК 57.577

Исследование ультраструктуры астроцитов гиппокампа мышей методом 3D-корреляционной микроскопии высокого разрешения

А.В. Алтунина^{1,2}, Д.О. Соловьева¹, К.Е. Мочалов¹, А.В. Попов¹, В.А. Олейников¹

¹Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Астроциты играют важную роль в функционировании центральной нервной системы, обеспечивая метаболическую поддержку и защиту нейрональных клеток, что позволяет предположить,

что астроциты участвуют в развитии патологий мозга [1]. При нормальных и при патологических процессах наблюдаются значительные изменения в нейрон-астроцитарных взаимодействиях, в частности, в астроцитарных отростках [2]. Клеточные и молекулярные механизмы изменений в отростках астроцитов мало изучены. Отчасти это связано с тем, что размеры астроцитарных отростков лежат за пределами разрешающей способности оптической микроскопии (ОМ). Метод корреляционной микроскопии такой как оптико-зондовая нанотомография (ОЗНТ), основанная на объединении сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ), конфокальной и флуоресцентной ОМ и техники ультрамикротомии (УМТ) позволит решить эту проблему [3].

Эффективность выполнения функций астроцитов во многом зависит от их морфологических характеристик. Для первичной флуоресцентной детекции астроцитов и их отростков было выполнено иммуноцитохимическое окрашивание срезов гиппокампа мыши на астроцитарные белки цитоскелета [4]: на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), транспортеры глутамата (GLT-1) и глп контактов (Cx43). Далее осуществлялась пробоподготовка образцов для измерений методом ОЗНТ, максимально сохранить структуру ткани, в том числе избежать ультраморфологических изменений в связи с преждевременной гибелью клеток. Измерения образцов проводились на уникальной научной установке – система зондово-оптической 3D-корреляционной микроскопии (<http://ckprf.ru/usu/486825/>), входящей в состав ЦКП ИБХ РАН (<http://ckp.ibch.ru/>). Установка позволяет делать ультратонкие срезы образца за счет алмазного ножа УМТ (вплоть до 20 нм) и проводить ОМ и СЗМ измерения в одной и той же области после каждого среза, накапливая данные для 3D реконструкции фрагмента образца.

Процедура измерений ОЗНТ происходит следующим образом. Подготовленные образцы закрепляются в специальный держатель системы ОЗНТ с возможностью регулировки угла положения образца относительно режущей кромки алмазного ножа для выбора рабочей плоскости проведения измерений в режиме ОЗНТ. Держатель образца устанавливается на XYZ-пьезосканере системы сканирования СЗМ, который, в свою очередь, смонтирован на подвижной консоли УМТ. Выполняется первичный УМТ-срез для образования плоской поверхности образца с возможностью проводить одновременные измерения методами СЗМ и ОМ. Далее после получения флуоресцентного изображения и выбора области измерения, устанавливается СЗМ-головка и проводится прецизионная фокусировка высокоапертурного объектива и согласование поля сканирования СЗМ и ОМ. Выполняется следующий УМТ-срез и измерения. Процедура повторяется до тех пор, пока не накопится достаточное количество 2D-СЗМ и ОМ изображений для последующей реконструкции и визуализации трехмерных структур астроцитарных отростков.

Результаты ультраструктурного исследования области целевого мечения GFAP приведены на рисунке 1. Полученные морфологические параметры толстых отростков астроцитов: средняя толщина структуры - 1.5 – 2 мкм, длина фрагмента отростка в объеме реконструкции – 4.5 мкм. Кроме того, методом 3D СЗМ (рис. 1Б) в исследуемой зоне выявлены внутренние структурные особенности размерами от 50 нм.

На рисунке 2 приведены результаты ультраструктурного исследования области целевого мечения мембранного белка Cx43. Наибольшая локация глп-контактов находится в окончаниях толстых веточек астроцитов. Полученная в ходе данных работ морфология области локации белка Cx43 может быть описана следующим образом: диаметр толстой части веточки астроцита примерно 1.5 мкм, при этом в ней выделяются структурные детали размерами 200-400 нм, длина тонкого отростка 2 мкм, а толщина варьируется в диапазоне от 150 до 400 нм.

Полученное флуоресцентное изображение распределения белков GLT-1 представляет собой широкое слабо структурированное поле, поскольку эти белки располагаются практически во всех компонентах астроцитов. Столь широкое поле «области интереса» создает существенные трудности для ультраструктурной идентификации компонент астроцитарного синцития в режиме 3D СЗМ.

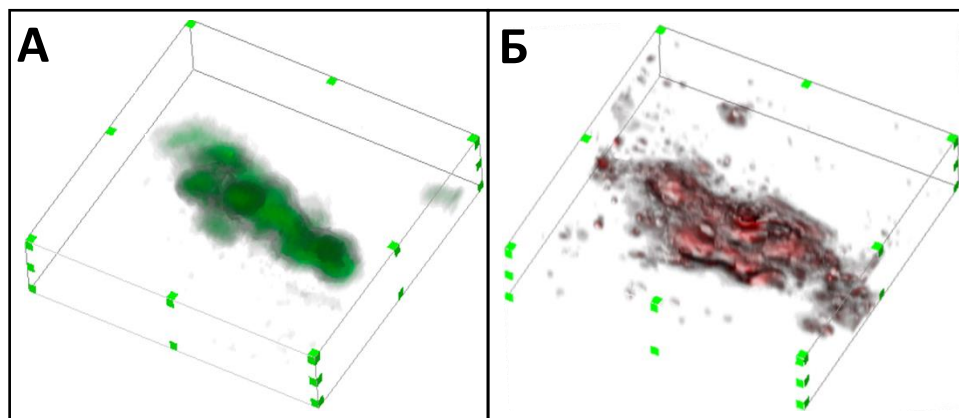


Рисунок 9. Коррелятивные 3D-ОМ (А) и 3D-СЗМ (Б) изображения астроцитов в области обнаружения флуоресцентно-меченного белка GFAP. Латеральные размеры составляют 5x5 мкм, а размер в направлении послойной реконструкции – 1.08 мкм. Латеральное разрешение АСМ-сканирования (Б) – 1024x1024 точек

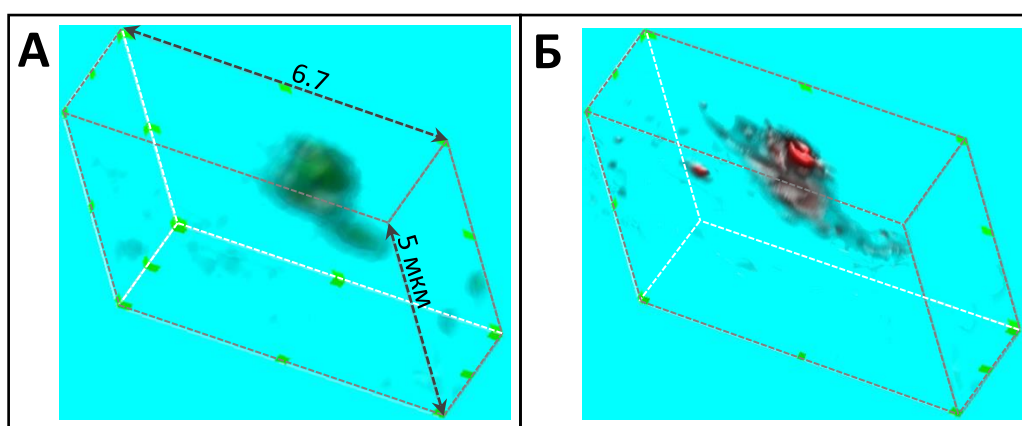


Рисунок 10. Коррелятивные 3D-ОМ (А) и 3D-СЗМ (Б) изображения астроцитов в области обнаружения флуоресцентно-меченного белка Сх43. Размеры обеих областей получения данных методом ОЗНТ одинаковы. При этом, латеральные размеры приведены на рисунке А, а размер в направлении послойной реконструкции – 1.08 мкм. Латеральное разрешение АСМ-сканирования (Б) – 1024x1024 точек.

Таким образом, по результатам работы, можно сделать важное заключение – на данный момент нами получены референсные ультраструктурные данные о компонентах астроцитарных сетей мозга здоровых мышей, которые в дальнейшем послужат основой для характеристики астроцитарных сетей при патологии.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-10071).

Литература

1. Verkhatsky A., Rodríguez J.J., Parpura V. Neuroglia in ageing and disease // Cell and Tissue Research. 2014. № 2 (357). С. 493–503.
2. Verkhatsky A. et al. Physiology of Astroglia // Physiological Reviews. 2018. № 1 (98). С. 239–389.
3. K.E. Mochalov, A.A. Chistyakov, D.O. Solovyeva, A.V. Mezin V.A. Oleiniko I.S. Vaskan M. Molinari I.I. Agapov I. Nabiev A.E. Efimov. Ultramicroscopy, 182, 118 (2017). DOI: 10.1016/j.ultramicro.2017.06.022
4. Rimmelé T.S. et al. The elusive presynaptic glutamate transporter // Neurochemistry International. 2016. (98). С.19-28

Структурно-функциональное исследование белка Lystar5 из морской звезды *Asterias rubens*, гомолога нейромодулятора Lynx2 человека

*А.М. Черников*¹, *М.А. Шуленко*^{2,3}, *А.С. Парамонов*³, *А.М. Махонин*⁴, *М.Л. Бычков*³, *Д.С. Кульбацкий*³, *С.В. Шабельников*⁵, *З.О. Шенкарев*³, *Е.Н. Люкманова*^{2,3}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

²Шэньчжэньский МГУ-ППИ Университет

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

⁴Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»

⁵Институт цитологии РАН

Белки семейства Lуб/uPAR выполняют ключевые роли в различных процессах животных: от ингибирования никотиновых ацетилхолиновых рецепторов жертвы α -нейротоксинами змей и регуляции процесса эмбриогенеза лягушек, до модуляции холинергической системы млекопитающих. Белки семейства характеризуются наличием LU-домена, формирующего 3 петли, из-за чего белки семейства получили название трехпетельных (three-finger proteins, TFPs). Такая структурная организация стабилизирована системой из 4 инвариантных дисульфидных связей, образующих бета-структурное ядро. Консервативность пространственной структуры LU-домена указывает на его эволюционную важность, а высокая вариабельность последовательностей петлевых участков обеспечивает большое функциональное разнообразие белков семейства. Способность трехпетельных белков регулировать работу никотиновых ацетилхолиновых рецепторов делает их перспективными моделями для разработки лекарств [1].

В ходе недавнего исследования протеома целоцитов морской звезды *Asterias rubens* было обнаружено 4 (Lystar 1-4) трехпетельных белка с неизвестной функцией [2]. В ходе биоинформатического анализа генома *Asterias rubens* нами обнаружено еще 5 генов, кодирующих трехпетельные белки (LyAr 1-5), один из которых (LyAr1, далее указывается как Lystar5) обладает высокой степенью гомологии с нейромодулятором человека Lynx2. Это свидетельствует о чрезвычайной важности ортологов нейромодулятора Lynx2 и их вовлеченности в эволюционно значимые процессы жизнедеятельности. Целью данной работы является определение пространственной структуры и исследование фармакологии белка Lystar5 из морской звезды *Asterias rubens*.

¹³C, ¹⁵N меченый и немеченый рекомбинантные аналоги белка Lystar5 были синтезированы в клетках *E. coli* в виде нерастворимых телец включения, затем солиubilизированы в 8 М мочеvine. Были проведены эксперименты по подбору оптимальных условий ренатурации, что позволило получить миллиграммовые количества рекомбинантных аналогов белка Lystar5. Гомогенность ренатурированных рекомбинантных аналогов была подтверждена с помощью масс-спектрометрии и аналитической ВЭЖХ.

Пространственная структура Lystar5 была получена с помощью ЯМР-спектроскопии. Исследование проводили на спектрометрах AVANCE-III-600 и AVANCE-III-800, укомплектованных криодатчиками (Bruker). Спектры снимали при 37 °C, pH 7 с добавлением 5% D₂O. Для изучения внутримолекулярной динамики Lystar5 на пико-наносекундном и микро-миллисекундном временных диапазонах использовали данные о релаксации ядер ¹⁵N.

Были проведены эксперименты по влиянию Lystar5 на активность никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. С помощью электрофизиологических экспериментов показано, что, как и нейромодулятор человека Lynx2, Lystar5 является негативным модулятором $\alpha 4\beta 2$ -никотинового ацетилхолинового рецептора. С помощью real-time PCR показано, что при инкубации Lystar5 с гиппокампальными нейронами крыс значительно уменьшилась экспрессия ацетилхолинэстеразы и субъединиц $\alpha 4$ и $\alpha 7$ никотинового ацетилхолинового рецептора. Для исследования возможных функций белков LyAr1-LyAr5 в организме звезды *Asterias rubens* были проведены real-time PCR эксперименты по оценке экспрессии предсказанных генов в 4 типах тканей морской звезды: целоцитах, целомическом эпителии, стенке тела луча и кончике луча.

Таким образом, нами был найден и исследован первый модулятор холинергической системы из морской звезды *Asterias rubens*, гомолог нейромодулятора человека Lynx2.

Работа поддержана РФФ № 19-74-20176.

Литература

1. Vasilyeva N.A., Loktyushov E.V., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N. Three-Finger Proteins from the Ly6/uPAR Family: Functional Diversity within One Structural Motif // Biochemistry (Moscow) 2017, 82, 1702–1715.

2. Shabelnikov S.V., Bobkov D.E., Sharlaimova N.S., Petukhova O.A. Injury Affects Coelomic Fluid Proteome of the Common Starfish, *Asterias rubens* // J. Exp. Biol. 2019, 222, jeb198556.

УДК 577.32

Комбинационное и гигантское комбинационное рассеяние рибофлавина и его производных

Е.Д. Белицкая^{1,2}, П.А. Демина¹, А.Н. Генералова¹, В.А. Олейников¹, А.В. Залыгин^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

Рибофлавин (витамин В2) и его производные (люмихром (изоалаксазин), мононуклеотид флавина (ФМН) и адениндинуклеотид флавина (ФАД)) участвуют в качестве коферментов во многих важных процессах жизнедеятельности организма [1]. Рибофлавин является перспективным соединением для использования как в качестве противоракового, так как антибактериального агента, поскольку способен участвовать в фотохимических реакциях с образованием активных форм кислорода. Индивидуальное облучение рибофлавина (при концентрациях ниже (30 мкМ) синим светом не вызывает цитотоксичности, и не приводит к побочным эффектам, как было показано [2,3].

Серебряные наночастицы имеют широкое применение для решения различных задач, в частности биомедицины, поскольку обладают существенными антибактериальными свойствами [4]. Наши исследования показали, что наночастицы серебра в комплексе с рибофлавином проявляют усиленный цитотоксический эффект. Поэтому актуальной задачей является изучение механизмов взаимодействия наночастиц серебра и рибофлавина.

В современном мире спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) имеет множество применений, в частности, в биологической диагностике [5]. Гигантское комбинационное рассеяние света (ГКР) является хорошим способом химического анализа структуры веществ и взаимодействия между ними. Эффект ГКР наблюдается как раз при взаимодействии образцов с шероховатостями металлических поверхностей, что делает этот метод наиболее подходящим для изучения механизмов взаимодействия флавинов с наночастицами серебра [6].

В данной работе на установке Renishaw inVia Qontor confocal Raman microscope было произведено измерение спектров КР флавиномононуклеотида, рибофлавина и люмихрома в порошковом виде, длина волны возбуждения — 785 нм, мощность возбуждающего излучения на образце — 80 мВт. Проводили усреднение 20-и спектров, при времени накопления 30 секунд для каждого. Полученные спектры представлены на рисунке 1.

На данных спектрах видны отличия в пиках на 742 см^{-1} , отвечающей за молекулярные колебания twists , $\delta_{\text{oop}}\text{C-H}$, $\delta_{\text{oop}}\delta\text{N}_3\text{-H}$, ring(I) , $\nu\text{C}_8\text{-C}_m$, $\delta\text{C}_6\text{C}_7\text{C}_m$, на 1224 см^{-1} , отвечающей за молекулярные колебания Rings (I, III) , $\delta\text{C-H}$, $\nu\text{C}_8\text{-C}_m$, $\nu\text{C}_7\text{-C}_m$, $\delta\text{N}_3\text{-H}$, на 1343 и 1345 см^{-1} , отвечающей за молекулярные колебания $\nu\text{C-C (I, II, III)}$, $\delta\text{N}_3\text{-H}$, $\nu\text{C-N(II, III)}$ и на 1489 и 1495 см^{-1} , отвечающей за молекулярные колебания $\nu_a\text{C}_m\text{-C}_8\text{-C}_7$, $\nu_a\text{C}_m\text{-C}_7\text{-C}_8$, $\nu\text{C-C(I)}$, $\delta\text{C-H}$. Указанные связи находятся в изоаллоксазиновых кольцах. По перечисленным выше пикам можно сделать вывод о том, что остаток рибита в рибофлавине и остаток ортофосфорной кислоты в флавиномононуклеotide влияют на смещение электронной плотности в том числе и в изоаллаксазиновых кольцах.

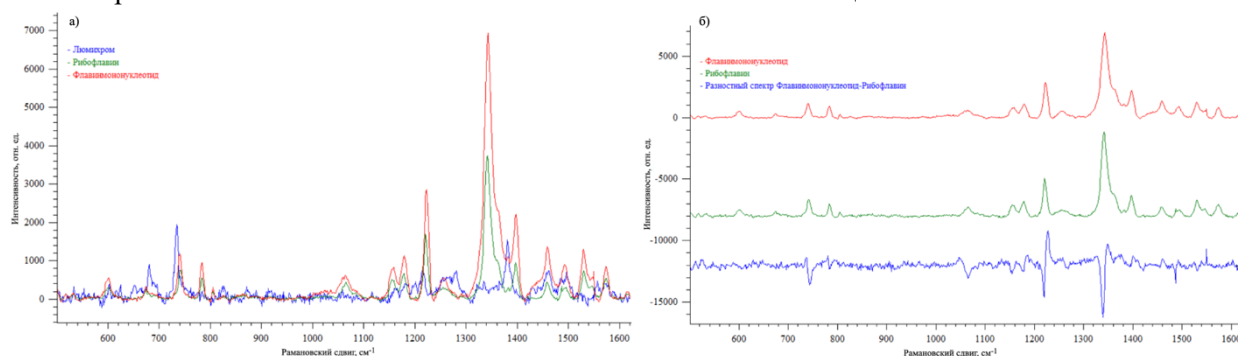


Рисунок 1. (а) Спектры КР ФМН, рибофлавина и люмихрома; (б) спектры КР ФМН и рибофлавина, их разностный спектр; длина волны возбуждения – 785 нм

Были произведены измерения спектров ГКР рибофлавина, ФМН и люмихрома, длина волны возбуждения — 532 нм, мощность возбуждающего излучения на образце – 0,6 мВ. Было произведено усреднение 10-и спектров, время накопления – 60 секунд для каждого из образцов. Концентрация флавиномононуклеотида составляла 1 мг/мл, концентрация люмихрома составляла 0,04 мг/мл, концентрация рибофлавина составляла 0,1 мг/мл. Для люмихрома и рибофлавина была взята такая концентрация из-за низкой растворимости. Для проведения измерения 50 мкл анализата были смешаны с 50 мкл борогидридного золя. Полученные спектры представлены на рисунке 2.

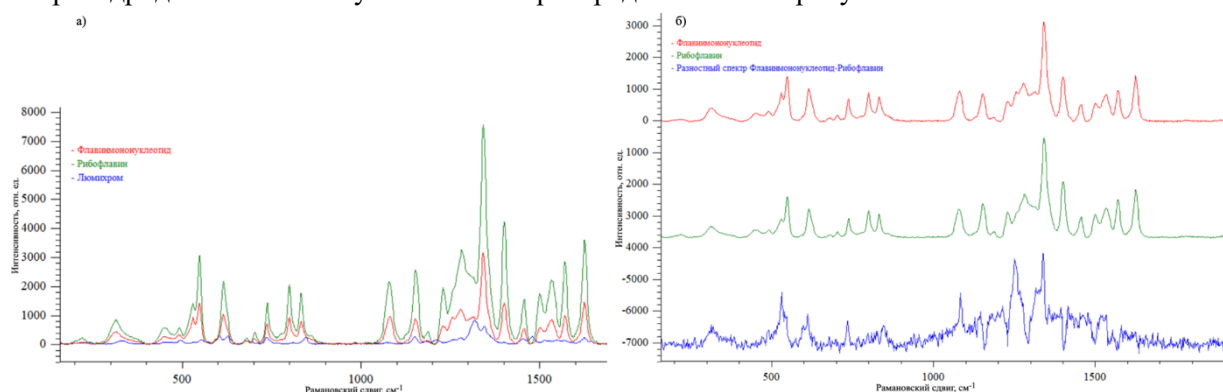


Рисунок 2. (а) Спектры ГКР ФМН, рибофлавина и люмихрома; (б) спектры ГКР ФМН и рибофлавина, их разностный спектр; длина волны возбуждения – 785 нм

Были обнаружены пики с положениями максимумов в низкочастотной области и в основной части спектра, которые не были получены на спектрах комбинационного рассеяния (532, 629, 678, 835, 1263, 1283, 1402, 1625 cm^{-1}). Было замечено, что пики с частотой меньше 1345 cm^{-1} смещаются в высокочастотную область примерно на 10 cm^{-1} , а правее этой частоты – примерно на 10 cm^{-1} в низкочастотную область. Это может свидетельствовать о смещении электронной плотности в изоаллаксазиновых кольцах, исследуемых флавинов. По полученным спектрам можно определить, что серебряные наночастицы активнее связываются с молекулами рибофлавина, по сравнению с флавиномононуклеотидом и люмихромом, так как наблюдается более интенсивное увеличение сигнала получаемых спектров.

Литература

1. Bajzath C., Ballou D., Bombarda E., Cecchini G., Dumit V. I., Eger B. T., Zhong D. Complex Flavoproteins, Dehydrogenases and Physical Methods. – Walter de Gruyter, 2013.
2. Akasov R. A., Sholina N. V., Khochenkov D. A., Alova A. V., Gorelkin P. V., Erofeev A. S., Generalova A. N., Khaydukov E. V. Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide //Scientific reports. – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. 1-11
3. Шолина Н. В., Акасов, Р. А., Хоченков, Д. А., Генералова, А. Н., Семчишен В. А., Хайдуков, Е. В. Фотодинамическая терапия солидных опухолей in vitro и in vivo с применением комбинации рибофлавина и наноразмерных апконвертирующих фосфоров //Альманах клинической медицины. – 2019. – Т. 47. – №. 7. – С. 647-653.
4. Schultz D. A. Plasmon resonant particles for biological detection //Current opinion in biotechnology. – 2003. – V. 14. – No.1. – P. 13-22.
5. Mochalov K., Solovyeva D., Chistyakov A., Zimka B., Lukashev E., Nabiev I., & Oleinikov V. Raman and SERS spectroscopy of D96N mutant bacteriorhodopsin //Materials Today: Proceedings. – 2016. – V. 3. – №. 2. – P. 497-501.
6. Nie S., Emory S. R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering //science. – 1997. – V. 275. – No.5303. – P. 1102-1106.

УДК 2788

Исследование педиоцин-подобных бактериоцинов с неканонической структурой

Д.В. Кононова^{1,2}, Д.В. Антошина², С.В. Баландин², Т.В. Овчинникова^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Распространение резистентности различных патогенов к существующим противомикробным препаратам делает актуальным поиск альтернативных средств борьбы с инфекциями. Среди кандидатов на роль новых антибиотиков важное место занимают природные антимикробные пептиды (АМП), распространенные во всех царствах живых организмов. АМП являются незаменимыми компонентами врожденного иммунитета многоклеточных организмов и факторами борьбы за экологическую нишу у одноклеточных. В настоящее время бактерии, синтезирующие АМП (бактериоцины) путем рибосомального биосинтеза и проявляющие антагонизм в отношении гнилостных и патогенных микроорганизмов, широко применяются в пищевой промышленности и в индустрии пробиотиков. Оценка терапевтического потенциала бактериоцинов и их модифицированных аналогов является предметом многочисленных исследований. Изучение механизмов действия бактериоцинов позволяет обнаруживать новые молекулярные мишени, что, в свою очередь, открывает путь для разработки новых антимикробных агентов.

Педиоцин-подобные бактериоцины (бактериоцины класса IIa) содержат характерную аминокислотную последовательность YGNG(V/L) в N-концевой части молекулы (педиоциновый бокс). Большинство аминокислотных замен в этой части молекулы приводят к существенной потере антимикробной активности. В качестве основного объекта исследования нами был выбран ацидоцин А, представитель данного класса с неканонической структурой. Он отличается от других бактериоцинов класса IIa более протяжённой аминокислотной последовательностью (58 а.о.), большим размером внутримолекулярного кольца (21 а.о.), замкнутого дисульфидной связью, высоким суммарным положительным зарядом молекулы и неканонической структурой педиоцинового бокса, который содержит дополнительный остаток треонина (YGTNGV). Спектр антимикробной активности у этого пептида значительно шире, чем у других педиоцин-подобных бактериоцинов. Ранее было показано, что мутагенез педиоцинового бокса и даже полное его удаление приводят лишь к частичной потере активности данного пептида [1].

Данная работа, являющаяся продолжением структурно-функционального исследования ацидоцина А, состояла в получении укороченных рекомбинантных аналогов ацидоцина А (рис. 1), а также его гибридов с авицином А, классическим представителем педиоцин-подобных бактериоцинов (рис. 2), с целью поиска фрагмента молекулы, отвечающего за мембранотропную активность полноразмерного пептида.



Рисунок 1. Укороченные аналоги ацидоцина А. Аминокислотные остатки цистеина выделены жёлтым цветом, синим – основные аминокислоты, красным – кислые аминокислоты, зелёным – педиоциновый бокс, фиолетовым – замена цистеина на серин.

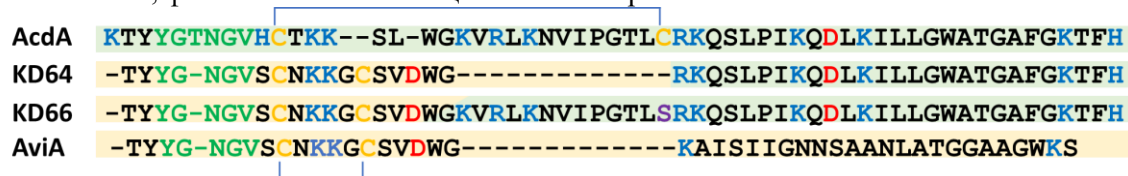


Рисунок 2. Гибриды ацидоцина А (AcdA) и авицина А (AviA). Аминокислотные остатки цистеина выделены жёлтым цветом, синим – основные аминокислоты, красным – кислые аминокислоты, зелёным – педиоциновый бокс, фиолетовым – замена цистеина на серин, оранжевым – аминокислотная последовательность авицина А, зеленым – аминокислотная последовательность ацидоцина А.

Плазмидная конструкция для экспрессии гена ацидоцина А была подвергнута направленному мутагенезу с удалением фрагментов кодирующей последовательности и добавлением фрагментов, кодирующих участки последовательности авицина А. Рекомбинантные пептиды были получены путем гетерологической экспрессии в *E. coli* BL21 (DE3). Очистка пептидов проводилась с помощью металлохелатной хроматографии и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Тестирование антимикробной активности проводили методом серийных разведений в жидкой питательной среде на панели штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Нами было показано, что фрагменты полипептидной цепи ацидоцина А демонстрируют в среднем 4-8-кратное падение антимикробной активности по сравнению с полноразмерным пептидом. При этом разные участки цепи вносят приблизительно равный вклад в уровень активности, что не позволяет идентифицировать фрагмент, который можно было бы считать ключевым для функционирования пептида. По предварительным данным, присутствие С-концевой части последовательности усиливает эффект в отношении грамотрицательных бактерий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 22-14-00380.

Литература

1. Antoshina D.V., Balandin S.V., Bogdanov I.V., Vershinina M.A., Sheremeteva E.V., Toropygin I.Yu., Finkina E.I., Ovchinnikova T.V. Antimicrobial Activity and Immunomodulatory Properties of Acidocin A, the Pediocin-like Bacteriocin with the Non-Canonical Structure // *Membranes*, 2022, 12, 1253.

УДК 620.3

Влияние полимерных покрытий наночастиц на глубину их проникновения в солидные опухоли мышей

Е.Д. Терёшина^{1,2}, О.А. Колесникова^{1,2}, В.О. Шипунова^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

На сегодняшний день терапевтические препараты, направленные на лечение онкологических заболеваний, являются недостаточно эффективными, в основном, из-за своей высокой системной токсичности при внутривенном введении. Одним из решений данной проблемы является селективная доставка препарата в опухоль посредством наночастиц (НЧ) различной природы.

В частности, наночастицы на основе оксида железа обладают рядом преимуществ в качестве инновационных систем доставки лекарств: проявляют магнитные свойства, вследствие чего возможно управление НЧ с помощью внешнего магнитного поля; обладают низкой токсичностью и высокой биосовместимостью [1]. Помимо этого, поверхность НЧ может быть модифицирована различными полимерными покрытиями, например, для задачи высокоточного молекулярного нацеливания или связывания с терапевтическими агентами [2]. Независимо от цели использования конкретного полимерного покрытия, модификация поверхности приводит к изменению физико-химических свойств (например, размера или поверхностного заряда) магнитных НЧ, которые влияют на время циркуляции в организме, биораспределение, способность проникать в опухоль и другие параметры [3].

Целью данной работы являлось исследование зависимости глубины проникновения в опухоль магнитных наночастиц от различных полимерных покрытий данных частиц *ex vivo* с помощью оптической микроскопии, а также поиск оптимального с этой точки зрения покрытия. Для этого был разработан метод синтеза магнетита, позволяющие получать коллоидно-стабильные структуры типа “ядро-оболочка” с различными широко используемыми полимерами, такие как например, декстран, полиэтиленгликоль, хитозан и ряд других.

Данные НЧ были детально охарактеризованы методами динамического и электрофоретического светорассеяния, была подтверждена коллоидная стабильность наночастиц. Полученные НЧ инъецировали мышам Balb/c с привитыми подкожными солидными опухолями (клеточной линии СТ-26). Для определения глубины проникновения МНЧ в опухоль были получены криосрезы опухолей и разработан уникальный протокол цветного окрашивания магнетита и клеточных структур опухоли. В качестве красителей для клеточных структур были выбраны гематоксилин и эозин, а для визуализации магнитных НЧ проводили реакцию Перлса (рис. 1).



Рисунок 1. Визуализация опухоли с магнитными наночастицами *ex vivo* (пример). Криосрезы опухоли были окрашены гематоксилином, эозином и по Перлсу, затем сфотографированы с использованием цветной камеры микроскопа. Голубым цветом окрашены ядра клеток, розовым – неядерные структуры, сине-бирюзовым – скопления наночастиц (дополнительно обозначенные красными стрелками). Шкала 350 мкм.

Для оценки глубины проникновения НЧ в опухоль измеряли расстояние от точек накопления наночастиц до края криосреза опухоли, выбирали 10 максимальных значений и проводили усреднение для каждого вида наночастиц.

Согласно полученным данным, на глубину проникновения в опухоль влияет целый спектр факторов, таких как, например, длина полимера при его фиксированном составе, заряд полимера, его гидрофобность/гидрофильность, а также способность образовывать “гидратную шубу”.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ № 22-73-10141.

Литература

1. Shipunova V.O. et al. Comparative Evaluation of Engineered Polypeptide Scaffolds in HER2-Targeting Magnetic Nanocarrier Delivery. *ACS Omega*. 2022. 6(24):16000-16008.
2. Kovalenko V.L. et al. Lectin-Modified Magnetic Nano-PLGA for Photodynamic Therapy In Vivo. *Pharmaceutics*. 2023. 15(1):92.
3. Kotelnikova P.A. et al. Synthesis of Magnetic Nanoparticles Stabilized by Magnetite-Binding Protein for Targeted Delivery to Cancer Cells. *Dokl Biochem Biophys*. 2018. 481:198–200.

УДК 576.38

Progenies of MGCC-Derived Cells Repopulates Non-Small Cell Lung Cancer Cells in Vitro According to Senescent Non-MGCC Fractions

Z. Nofal¹, L. Alhaddad^{1,2}, M. Pustovalova^{1,3}, S. Leonov^{1,4}

¹ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)

² Faculty of Sciences, Damascus University

³ Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency

⁴ Institute of Cell Biophysics, RAS

A frequently observed source of heterogeneity in cancer is the presence of multinucleated giant cells (MGCCs), a special subpopulation that harbor stem-like functions and markers. Pre-existing MGCCs in tumors are now studied for their high tumorigenicity and treatment resistance [1], and as a hallmark of cancer stage [2]. The amount of MGCCs noticeably increases in response to genotoxic and hypoxic stresses [3]. Indeed, they were often found in the invasive front of colorectal cancer where cells are deprived of oxygen [4].

Another phenomenon exhibited by cancer cells upon exposure to stress and genotoxic treatments is senescence. Senescence is a physiological program that makes the cells enter a permanent cell cycle arrest in response to stress or telomere shortening. In the context of cancer, senescence is a double-edged sword. Cancerous cells can use it to escape cell death by initially activating stress-induced premature senescence (SIPS) program with subsequent restoring proliferative activity. On the other hand, the special secretome produced by senescent cells, named senescence-associated secretory phenotype (SASP), can enhance the immunological response against the tumor thereby halting its growth and progression [5]. Here we aimed to examine the impact of hypoxic and genotoxic stress responses in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines A549 (p53wild-type) and H1299 (p53null) on their ability to repopulate the tumor cells.

CoCl₂ is used as a hypoxia mimic to induce MGCCs formation. CoCl₂ stabilizes the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), and has been reported to induce the formation of MGCCs in human ovarian and breast cancer cell lines [6]. To explore the role of MGCCs as a source of tumor heterogeneity and a possible culprit in cancer recurrence, we used the CoCl₂ treatment to obtain and characterize cell sublines named A549CoCl₂ and H1299CoCl₂ as MGCC-derived progenies of parental A549 (p53wild-type) and H1299 (p53null) NSCLC cell lines. The same treatment was applied to the cells that have survived a clinically relevant regime of X-ray irradiation (A549IR and H1299IR sublines) to produce subline descendants named A549IRCoCl₂ and H1299IRCoCl₂, that underwent both stresses sequentially.

The pre-existing fraction of MGCCs in H1299 cell line (13.7%) was notably higher than that of A549 (3.9%). Both A549CoCl₂ and H1299CoCl₂ sublines showed an insignificant decrease in the content of MGCCs when compared to their parental cell lines (down to 3.35% and 12.77% respectively). Comparing to their respective parental cells, the A549IR subline experienced an increase (up to 6.51%, p<0.01), whereas the irradiation survived H1299IR cells witnessed a decrease (down to 9.44%, p<0.01) in MGCCs. A549IRCoCl₂ subline had a significant increase (by 1.79 times, p <0.001) compared to A549IR, and H1299IRCoCl₂ had an insignificant (p=0.0982) decrease to 8.31% compared to H1299IR cells.

As shown in Fig.1, hypoxic stress produces different impacts on the fraction of senescence-associated β -galactosidase positive (SA- β -Gal+) non-MGCCs cells, albeit having almost no effect on the same fraction of MGCCs (data not shown). A549CoCl₂ and A549IRCoCl₂ cells had a significantly larger (28.36%, p<0.01 and 15.22%, p<0.05, respectively) fraction of SA- β -Gal+ non-MGCCs cells compared to their parental cell lines A549 (22.83%) and A549IR (11%). H1299CoCl₂ and H1299IRCoCl₂ cells demonstrated a significant decrease (to 9.92%, p<0.01 and 21.4%, p<0.001, respectively) in the same fraction compared to the parental H1299 (14.78%) and H1299IR (28%) cells. In contrast, MGCCs unlike non-MGCCs, are impervious to the CoCl₂-induced changes in the senescence marker

To assess the propensity tumor cells to undergo virtually endless rounds of divisions (repopulation), the standard clonogenic assay was used in our study. As shown on Fig.2, the sublines having hypoxia-induced rise of the SA- β -Gal+ non-MGCC fraction (A549CoCl₂ and A549IRCoCl₂ also demonstrated an increase in ability to repopulate the tumor. On the other hand, the sublines experiencing hypoxia-induced decrease of the same fraction (H1299CoCl₂ and H1299IRCoCl₂) possessed respective decline in the plating efficiency.

It has been reported by Mirzayans et al. (2017), that irradiated cancer cells with a total loss of p53 function demonstrated higher content of MGCCs than those with functional p53 [3]. In this study, the content of MGCCs was evaluated only after a single dose of irradiation, while we observed the decrease in MGCCs fraction of p53null H1299 cells survived after a rigorous fractionated irradiation exposure. Perhaps, the genetic insults resulting from consecutive irradiation could have impaired the tumor cell ability to generate MGCCs and maintain their viability and genomic stability in the absence of the p53 function. Our observed increase of SA- β -Gal+ cells following CoCl₂ treatment of A549 and A549IR cells corroborates previously demonstrated HIF-dependent p53 up-regulation took place [7]. Along with the substantial increase of MGCCs in the A549IRCoCl₂ subline, this indicates to necessity of p53 for long-term survival of MGCCs rather than considering it as just a fail-safe against the initial formation of them.

To conclude, we have observed that neither the total amount of MGCCs nor their SA- β -Gal+ fraction correlate with the propensity to repopulate the tumor. In contrast, the hypoxic stress-induced changes in fraction of SA- β -Gal+ non-MGCCs mirror more precisely the ability of the sublines to generate the relapse populations. Our findings demand further investigations to clarify whether SASP of SA- β -Gal+ non-MGCCs confer growth of tumor cells in the absence of immunological surveillance. Alternatively, whether the offspring of wild-type p53 MGCCs are inherently more proliferative, or the hypoxia-induced increase in fraction of SA- β -Gal+ cells is merely a side effect of the functional p53 presence.

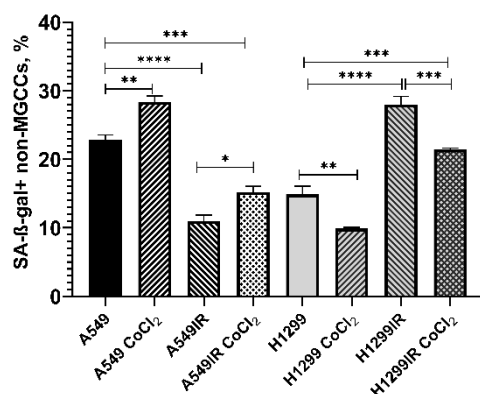


Figure1. The percentage of SA- β -Gal+ non-MGCCs in parental A549 and H1299 cells and their sublines. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

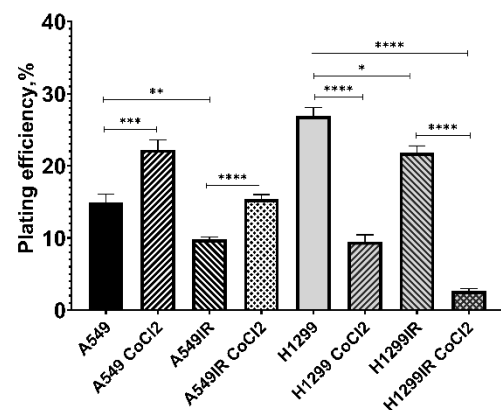


Figure 2. Plating efficiency of the parental A549 and H1299 cells and their sublines under anchorage dependent conditions. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

References

1. Zhang S, et al. Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene*, 2014. 33(1): p. 116-128.

2. *Malpica A., et al.* Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *The American journal of surgical pathology*, 2004. 28(4): p. 496-504.
3. *Mirzayans R., et al.* Multinucleated giant cancer cells produced in response to ionizing radiation retain viability and replicate their genome. *International journal of molecular sciences*, 2017. 18(2): p. 360.
4. *Zhang D., et al.* Daughter cells and erythroid cells budding from PGCCs and their clinicopathological significances in colorectal cancer. *Journal of Cancer*, 2017. 8(3): p. 469.
5. *Singh R., George J., Shukla Y.* Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy. *Cell division*, 2010. 5(1): p. 1-12.
6. *Liu K., et al.* Different p53 genotypes regulating different phosphorylation sites and subcellular location of CDC25C associated with the formation of polyploid giant cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2020. 39: p. 1-15.
7. *Zhang C., et al.* The interplay between tumor suppressor p53 and hypoxia signaling pathways in cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2021. 9: p. 648808.

УДК 577.25

Измерение электрофизиологических параметров нейрональной активности в срезах гиппокампа мышей

С.А. Кузнецова^{1,2}, А.В. Попов², А.В. Семьянов²

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)
Лаборатория внесинаптической передачи (Институт биоорганической химии РАН)

Важной задачей в электрофизиологических исследованиях является разработка открытого программного обеспечения, позволяющего проводить автоматизированный анализ записей синаптических и внесинаптических токов. Интерес к анализу этих записей вызван возможностью использования результатов в разработке таргетной терапии заболеваний, связанных с нарушениями в синаптической или внесинаптической передаче, или в исследовании прямых и побочных эффектов комбинированных препаратов [1-3]. Существующие методы анализа не позволяют рассчитывать необходимое число параметров в автоматизированном режиме. В ручном режиме анализ требует значительных трудозатрат. Нами была разработана программа, которая использует современные алгоритмы анализа, рассчитывает оптимальное число параметров без потери физиологически значимой информации за сравнительно короткое время.

При разработке программного обеспечения использовались данные, записанные с пирамидальных нейронов гиппокампа мыши в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации потенциала.

Разработанное программное обеспечение поддерживает большинство стандартных форматов файлов электрофизиологических записей благодаря использованию специализированного модуля языка программирования Python [4] и предлагает два режима анализа: анализ одной записи синаптических токов и групповой анализ записей.

Для количественной оценки и интерпретации активности отдельных нейронов программа включает алгоритмы для вычисления электрических параметров клетки (входное сопротивление, емкость клеточной мембраны и последовательное сопротивление). Входное сопротивление отражает число ионных каналов, расположенных на мембране. Емкость характеризует размер клетки [5]. А по динамике последовательного сопротивления отслеживается качество записи. Программное обеспечение так же предусматривает алгоритм для нахождения базовой линии. Базовая линия сигнала определяется комплексом параметров: электрофизиологией мембраны клетки (активация синаптических рецепторов, электродвижущая сила, потенциал реверсии ионов и др.), контактом клетки с пипеткой и стохастическими параметрами (шум, нестабильная наводка). Из значения базовой линии определяются удерживающий и тонический токи. В разработанную программу включены и алгоритмы детектирования синаптических токов и расчета их параметров (амплитуда, частота, скорость нарастания, константа затухания). Путем сравнения значений параметров синаптических токов можно изучать механизмы действия нейромедиаторов и блокаторов в разных физиологических условиях [6-7].

При запуске программы в режиме анализа одной электрофизиологической записи автоматически создается папка на персональном компьютере пользователя, куда в процессе выполнения анализа сохраняются файлы с зависимостями каждого из рассчитываемых параметров от времени, таблицы с их значениями и кумулятивные распределения.

Режим группового анализа предлагает построение и визуализацию общей статистики для нескольких выбранных записей. Программное обеспечение предусматривает следующие

статистические тесты: Т-критерий студента, критерий Уилкоксона, U-критерий Манна-Уитни и тест Колмогорова-Смирнова.

При необходимости существует возможность модификации программы вследствие открытости кода [8]. Программное обеспечение преобразовано в сервис (FastApi Swagger) [9] для работы без взаимодействия с кодом, что значительно упрощает процесс анализа.

Было проведено сравнение результатов анализа, полученных в разработанном программном обеспечении, с результатами из аналогичных программ. Численные результаты параметров синаптических токов показали близкие значения. Однако, разработанный алгоритм показал превосходство в скорости выполнения анализа, в количестве параметров, вычисляемых в автоматизированном режиме и удобстве использования.

Литература

1. Spoto G., Valentini G., Saia M. C., Butera A., Amore G., Salpietro V., Nicotera A. G. and Di Rosa G. Synaptopathies in Developmental and Epileptic Encephalopathies: A Focus on Pre-synaptic Dysfunction. *Front. Neurol.* (2022) 13:826211. doi: 10.3389/fneur.2022.826211
2. Taoufik E., Kouroupi G., Zygogianni O., Matsas R. Synaptic dysfunction in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases: an overview of induced pluripotent stem-cell-based disease models. *Open Biol.* 2018 Sep;8(9):180138. doi: 10.1098/rsob.180138. PMID: 30185603; PMCID: PMC6170506.
3. Wang H., Balice-Gordon R. Editorial: Synaptic Diseases: From Biology to Potential Therapy. *Front. Synaptic Neurosci.* (2022) 14:846099. doi: 10.3389/fnsyn.2022.846099
4. Документация модуля Neo Python (<https://neo.readthedocs.io/en/stable/>)
5. Paulus, W., Rothwell, J. C. Membrane resistance and shunting inhibition: Where biophysics meets state-dependent human neurophysiology. *J. Physiol.* 2016, 594, 2719–2728.
6. Semyanov A., Kullmann D. M. Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors. *Neuron.* 2000 Mar;25(3):663-72. doi: 10.1016/s0896-6273(00)81068-5. PMID: 10774733.
7. Tian N., Hwang T. N., Copenhagen D.R. Analysis of excitatory and inhibitory spontaneous synaptic activity in mouse retinal ganglion cells. *J Neurophysiol.* 1998 Sep;80(3):1327-40. doi: 10.1152/jn.1998.80.3.1327. PMID: 9744942.
8. https://github.com/SvetlanaKuznetsova/bachelor_thesis
9. <https://fastapi.tiangolo.com/features/>

УДК 620.3

Магнитно-полимерные наночастицы для адресной доставки к клеткам-мишеням *in vitro* и *in vivo*

В.Л. Коваленко¹, О.А. Колесникова^{1,2}, Е.Н. Комедчикова^{1,2}, В.О. Шипунов^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Несмотря на значительный прогресс в разработке новых препаратов для лечения раковых заболеваний, рак молочной железы до сих пор является основной причиной смерти от рака среди женщин во всем мире [1], поэтому перед исследователями стоит задача разработки эффективных, неинвазивных методов лечения [2]. В современной онкологии одним из наиболее перспективных направлений исследований является разработка препаратов для фототерапии, в основе которой лежит гипертермия или образование свободных радикалов/активных форм кислорода, генерируемых фотосенсибилизаторами при облучении светом из ближнего инфракрасного диапазона с минимальной токсичностью для нормальных тканей. Эффективность такого метода зависит не только от свойств фотосенсибилизатора, но и от процента его накопления в опухоли. Для повышения эффективности накопления наночастиц в опухоли разрабатываются различные методы адресной доставки, которые включают в себя доставку посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза и/или магнитоуправляемую доставку посредством накопления наночастиц в опухоли под действием внешнего электромагнитного поля [3].

В данной работе были синтезированы полимерные наночастицы из биосовместимого полимера поли-лактид-ко-гликолида (PLGA), нагруженные магнетитом и флуоресцентным красителем IR775 (mPLGA/IR775). Благодаря встраиванию магнетита в полимерную матрицу стало возможным количественное отслеживание накопления полученных наночастиц в различных органах и осуществление магнитоуправляемой доставки, а IR775 позволил проводить флуоресцентную биовизуализацию *in vivo*, а также светоиндуцированную фотодинамическую терапию. Для придания адресных свойств, наночастицы были конъюгированы с лектинами различного происхождения.

Скрининг методом проточной цитометрии показал, что наибольшей специфичностью обладают наночастицы, конъюгированные с конканавалином А (ConA) – лектином, полученным из бобового растения канавалии мечевидной (*Canavalia ensiformis*). При облучении синтезированных наночастиц лазером с длиной волны 808 нм, их цитотоксичность *in vitro* увеличилась в 5 раз, что подтверждает наличие выраженной фотоиндуцированной цитотоксичности. Эксперименты *in vivo* на мышах Balb/c с солидными опухолями молочной железы показали, что после внутривенного введения наночастицы mPLGA/IR775-ConA эффективно накапливались в опухолях под воздействием внешнего магнитного поля и создавали яркий флуоресцентный сигнал для биовизуализации *in vivo* (рис. 1) и приводили к 100% ингибированию роста опухоли после одного сеанса фотодинамической терапии, даже при большом объеме опухоли (более 200 мм³) (рис. 2) [4].

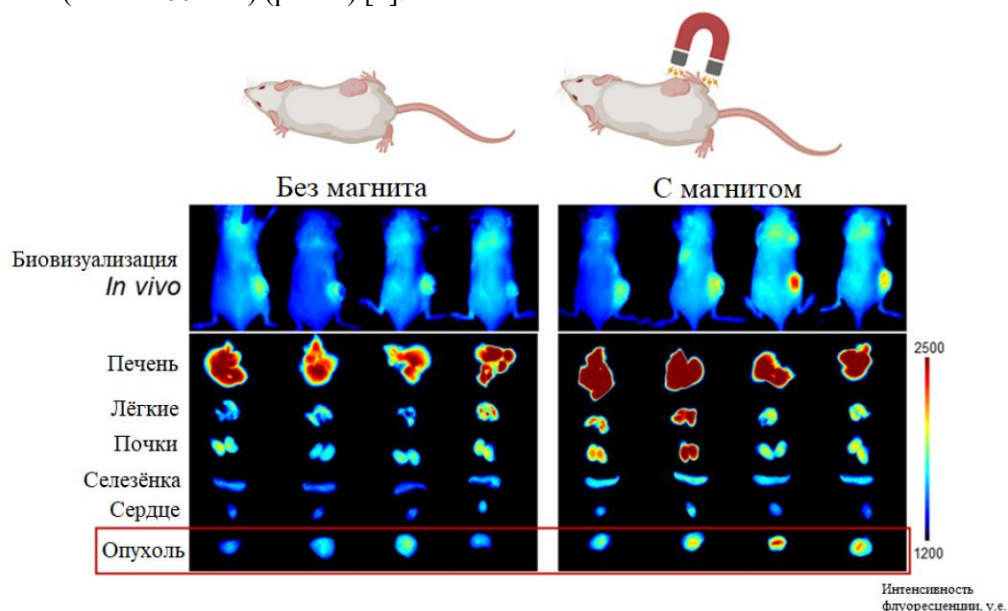


Рисунок 1. Флуоресцентные изображения мышей через 24 ч после внутривенного введения mPLGA/IR775-ConA, к опухолям которых не был/был приложен магнит. *In vivo* изображение органов мышей с/без магнитной доставки.

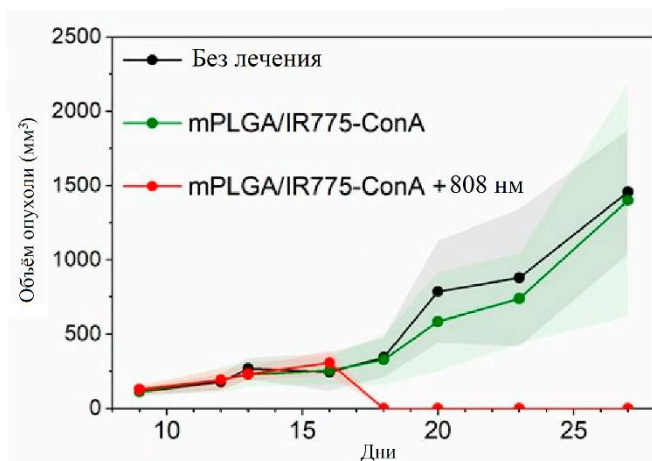


Рисунок 2. Динамика роста опухолей без лечения, системном вводе наночастиц mPLGA/IR775-ConA и при системном вводе наночастиц и облучении 808 нм лазером.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ № 22-73-10141.

Литература

- 4 Hyuna S. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2021; 71: 209–249.
- 5 Obozina A.S. et al. Genetically Encoded Self-Assembling Protein Nanoparticles for the Targeted Delivery *In Vitro* and *In Vivo*. *Pharmaceutics* 2023, 15, 231.
- 6 Shipunova V.O. et al. Targeting Cancer Cell Tight Junctions Enhances PLGA-Based Photothermal Sensitizers' Performance *In Vitro* and *In Vivo*. *Pharmaceutics* 2022, 14, 43.

Study of TGF- β inhibitors release from alginate hydrogel to suppress the Epithelial-Mesenchymal Transition

L. Ibrahim^{1,2}, S.N. Mantrov³, R.A. Akasov^{2,4}, A.V. Zvyagin^{1,2,4}

¹Moscow Institute of Physics and Technology

²Sechenov University, Institute for Molecular Theranostics

³Mendeleev University of Chemical Technology, Russia

⁴Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences

Transforming growth factor- β (TGF- β) receptor plays an important role in immune and stem cell regulation and differentiation, cancer progression, auto-immune diseases, and infectious disease [1]. One of the promising approaches in the cancer treatment is the development of novel drugs able to inhibit the TGF- β receptor activation to prevent epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and tumor invasion and metastasis. Due to the proven side effects in case of intravenously or orally delivery administration routes, it is important to deliver these drugs directly to the tumor sites.

We propose to encapsulate potential TGF- β inhibitors into alginate gel to realize local drug delivery strategy and demonstrate the efficacy of this approach *in vitro*.

To this aim, we evaluated the cytotoxicity and inhibitory efficiency of commercially available TGF- β receptor inhibitor, A-83-01, and perspective drug, TM-12 designed and synthesised in house. Both tested drugs appeared to exhibit therapeutic effect, as demonstrated by the inhibition of the cell motility of highly malignant human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells in the scratch assay and inhibition of the SMAD 2/3 phosphorylation in Western blot assay. To test the therapeutic effect of the encapsulated drugs, we impregnated alginate beads with

A-83-01 (2% (w/v) alginate and 500 mM of A-83-01 solidified in 10 mg/mL of CaCl₂ solution in sterile conditions). The release of A-83-01 was confirmed by the scratch assay, and the concentration-dependent drug motility inhibition was observed, as shown in Figure 1.

Testing of the therapeutic efficacy was extended to three-dimensional (3D) cell models. Tumor spheroids of MDA-MB-231 cells were produced, using hanging drop and liquid overlay techniques, followed by their embedment into an alginate gel to recapitulate the 3D conditions of tumor growth *in vitro*.

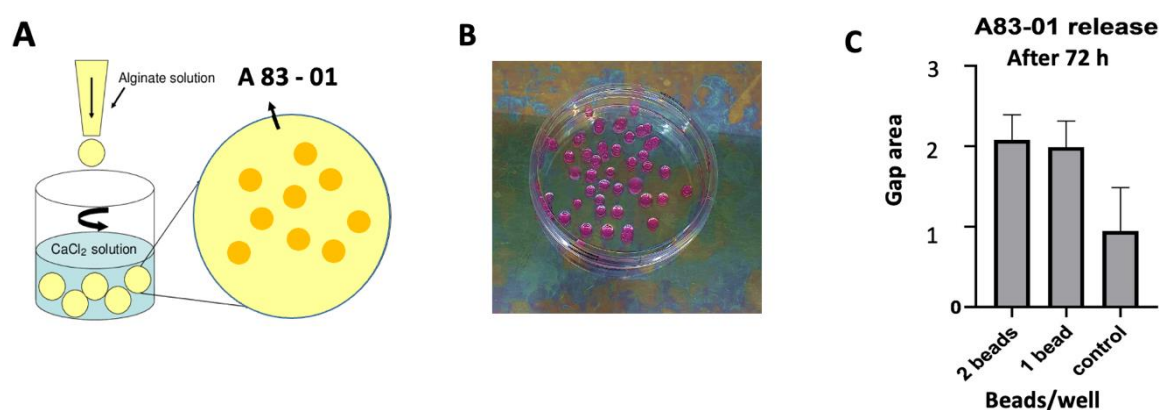


Figure 1. The scheme of A-83-01 encapsulation into the alginate gel (A), the obtained beads (diameter 15 mm) (B), and the result of the scratch assay using MDA-MB-231 cells (C).

In summary, we demonstrated the feasibility of the local delivery of TGF-beta inhibitor drugs *in vitro* and their therapeutic effects.

The study was supported by the Russian Science Foundation Grant No. [21-74-30016](https://doi.org/10.1038/nrc822).

References

1. Thiery J. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442–454 (2002). <https://doi.org/10.1038/nrc822>

Изменение активности кислой фосфатазы пресноводных моллюсков под влиянием экотоксикантов

В.С. Соколов, Д.Т. Карпенко, Т.А. Чернов

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Антропогенное загрязнение водных объектов является одной из глобальных проблем экологии современности. Состав воды является важнейшим экологическим фактором, который существенно влияет на рост, развитие, устойчивость и физиологические процессы у гидробионтов.

Действие экотоксикантов проявляется на метаболическом, клеточном, организменном, популяционном, биоценотическом и экосистемном уровнях [1]. Биохимические методы, использованные при исследовании, позволили выявить изменения обмена веществ в организме живородки речной, наступающие до появления физиологических, морфологических и других отклонений от нормы [2], дают возможность выявить границы адаптационных способностей, определить границу воздействия инсектицида метафоса.

В связи с этим является возможным использовать биохимическую диагностику не только для оценки интенсивности загрязнения, но и для идентификации отдельных групп токсикантов [3].

В данной работе исследовано влияние токсиканта органического происхождения — метафоса на количественные изменения метаболизма, в частности на активность кислой фосфатазы (КФ).

Измерение активности КФ производилось по методу Бессея - Лаури - Брока [4]. Метод основан на способности КФ к расщеплению р-нитрофенилфосфата с образованием р-нитрофенола, который в щелочной среде дает желтое окрашивание. Оптическая плотность растворов измерялась при $\lambda = 415$ нм и с помощью калибровочной кривой, построенной по растворам р-нитрофенола с известной концентрацией, вычислялось количество ферментированного субстрата за время протекания реакции.

Для проведения биохимического анализа готовились экстракты водорастворимых белков пищеварительной железы моллюска. Все измерения производили в 6 повторах. Статистическая проверка полученных данных производилась с помощью t-критерия Стьюдента, показавшего достоверность различий на уровне значимости $0,05 \leq$

Полученные результаты, представленные в единицах активности фермента (образование 1 мкМоль р-нитрофенола за 1 минуту на 1 мг белка при 37°C), приведены на рисунке 1.

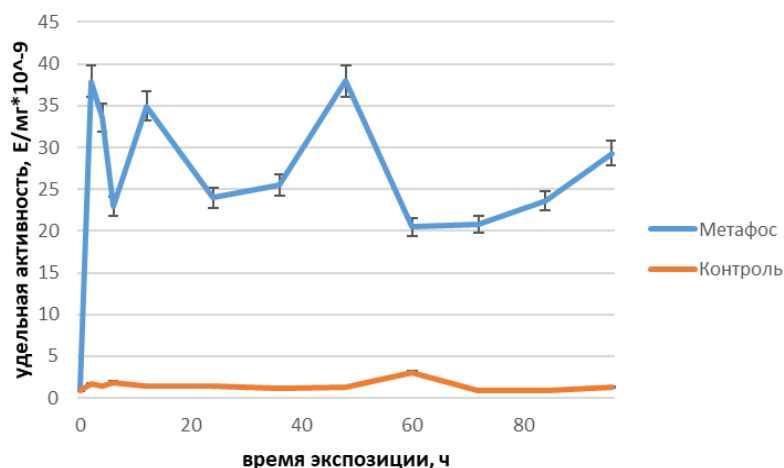


Рисунок 1. Изменение активности кислой фосфатазы

Как можно заметить, активность кислой фосфатазы в контрольной группе колеблется с течением времени, что связано с естественными биоритмами. В связи с этим мы приняли значения активности фермента в контрольной группе за единицу для наиболее наглядного отображения результатов исследования. Результаты изменения активности кислой фосфатазы в норме и при воздействии экотоксиканта метафоса, относительно контрольных значений – отображены на рисунке 2.

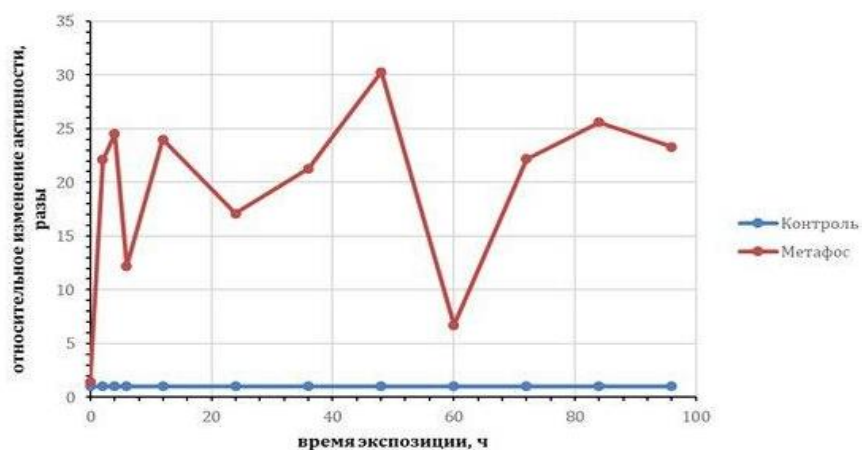


Рисунок 2. Изменение активности кислой фосфатазы в эксперименте, относительно контрольных значений

Результаты исследования показали, что на протяжении 96 часов активность КФ у моллюсков опытной группы под влиянием инсектицида метафоса постоянно находится выше, чем у контрольной группы, угнетения активности не наблюдается.

Максимальное изменение активности КФ по отношению к контрольной группе отмечено на 48 часу эксперимента, что превышает контрольное значение в 30 раз.

Наиболее незначительное повышение активности исследуемого фермента наблюдается на 60 часу экспозиции. Можно заметить, что в данном случае активность КФ отклоняется от показателей контрольной группы в семь раз.

В ходе исследования было выявлено, что воздействие метафоса привело к значительному повышению активности КФ у живородки речной, что может служить биохимическим маркером загрязнения водоемов данным токсикантом. КФ в норме используется организмами для освобождения присоединенных фосфорильных группировок от различного спектра органических молекул. Увеличение активности фермента является логичным ответом при столкновении с фосфорилированными молекулами экотоксиканта. Регуляция активности большинства фосфатаз обеспечивается их регуляторными субъединицами. Для некоторых случаев известно до 100 регуляторных субъединиц, способных изменять как активность, так и субстратную специфичность фермента [5]. Мы подозреваем аналогичный механизм изменения активности фермента, однако, подтверждение этой гипотезы требует дальнейших исследований, включающих в себя исследования различий в экспрессии контрольных особей и особей, подвергшихся воздействию экотоксиканта.

На основании данных, полученных в ходе проведенного эксперимента, было доказано, что целесообразно использование активности изученного фермента в качестве маркерного биохимического показателя токсического загрязнения водной среды метафосом. Исследование проведено благодаря поддержке ЦКП Прикладной Генетики МФТИ, Россия (грант поддержки 075-15-2021-684).

Литература

1. Цветков И.Л., Попов А.П., Коничев А.С. Комплекс кислых фосфатаз живородки речной в норме и при интоксикации ионами кадмия. // Биохимия. 2003. Т. 68. Вып. 12. С. 1648–1656
2. Коничев А.С., Попов А.П., Цветков И.Л., Филков П.В. Ферменты как биохимические маркеры загрязнения воды. // Приложение к Вестнику МГОУ. Серия «Естественные науки». География, экология, экономика: актуальные проблемы науки и образования. М.: Изд-во МГОУ, 2005. С. 151–153
3. Немова Н.Н., Меццержакова О.В., Лысенко Л.А., Фокина Н.Н. Оценка состояния водных организмов по биохимическому статусу. Труды Карельского научного центра РАН. Выпуск 5, 2014
4. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. - М.: Высшая школа, 1981. С. 272
5. Virshup D.M., Shenolikar S. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. Molecular Cell. 2009. P. 537

УДК 57.021

Оценка антиоксидантного потенциала тетранитрозильного комплекса железа с пеницилламиновыми лигандами на мышцах с моделью кардиотоксичности

А.М. Забельникова¹, И.И. Файнгольд², Н.А. Санина², А.В. Смолина²

¹ФГБОУ ВО Ивановский государственный университет

²ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН

Окислительный стресс (ОС) возникает, когда система антиоксидантной защиты организма не справляется с избыточным образованием свободных радикалов, в результате чего окисляются важнейшие биологические молекулы, нарушается функционирование органоидов, которое завершается гибелью клеток. Известно, что ОС лежит в основе патогенеза социально значимых заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых (ССЗ), при развитии которых он вызывает дисфункцию эндотелия, воспаление, снижает уровень биодоступного оксида азота (NO), способствует пролиферации клеток гладкой мускулатуры сосудов, изменяет сосудистый ответ и вазотон [1]. Известно, что монооксид азота (NO) оказывает плейотропное действие, поддерживая гомеостаз сердечно-сосудистой системы (ССС): выполняет антитромботическую, противовоспалительную, антиоксидантную функции, регулирует тонус сосудов [2]. Сегодня нитраты активно применяются для лечения ряда ССЗ (также используют блокаторы кальциевых каналов, бета-блокаторы и тромболитики) [3]. Однако длительное применение нитратов приводит к лекарственной толерантности и побочным эффектам, требующим отмены препарата. Поэтому поиск новых доноров NO продолжается и важной задачей является создание лекарственных средств, воздействующих одновременно на несколько ключевых мишеней и процессов, связанных с развитием ССЗ.

Сера-нитрозильные комплексы железа (СНКЖ) высвобождают молекулы NO в физиологических условиях, не требуя дополнительной активации [4]. Но имеются данные, что нейтральные комплексы плохо растворимы в воде, а анионные, хоть и водорастворимы, неэффективно донируют NO [5].

В данной работе оценивается антиоксидантный потенциал катионного тетранитрозильного комплекса железа с пеницилламиновыми лигандами $[\text{Fe}_2(\text{S}(\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{NH}_3\text{COOH}))_2(\text{NO})_4)\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (соединение 1) на мышцах с моделью кардиотоксичности, вызванной азитромицином (AZM) (проводилось в лаборатории физико-химической биологии физиологически активных соединений ФИЦ ПХФ и МХ РАН по методу [6]). Соединение I имеет серосодержащие радикалы природного происхождения (пеницилламин) и NO группы. Ранее были обнаружены его антигипертензивные и противоишемические свойства [7], что делает его многообещающим кандидатом для разработки лекарственных средств для терапии ССЗ.

Исследование антиоксидантного действия соединения I проводилось по методу [8] с модификациями, основанном на реакции между ТБК (тиобарбитуровой кислотой) и активными продуктами перекисного окисления липидов с образованием окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при $\lambda=532$ нм. Для терапии мышей с моделью кардиотоксичности использовали водный раствор соединения I в дозах 18 и 36 мг/кг (в/б). В гомогенате печени мышей экспериментальных групп определяли концентрацию ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) в качестве косвенного маркера перекисного окисления липидов, вызванного ОС у мышей с моделью кардиотоксичности. Измерения проводили на спектрофотометре Agilent Cary 60 UV-Vis (Agilent, США). Концентрацию белка определяли по известному методу Лоури. Концентрацию ТБК-АП рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{(A_o - A_k)}{\varepsilon \cdot l \cdot C}$$

где K – концентрация ТБК-АП; A_o – оптическая плотность опытного образца; A_k – оптическая плотность контрольного образца; ε – молярный коэффициент экстинкции, равный $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; l – длина кюветы; C – концентрация белка.

Впервые показано, что введение соединения I в дозе 18 мг/кг мышам с моделью кардиотоксичности эффективно снижает количество ТБК-АП в гомогенатах их печени (\approx на 49% по сравнению с группой мышей с моделью кардиотоксичности без терапии), т.е. уменьшает интенсивность процесса перекисного окисления липидов, предотвращая развитие окислительного стресса, в основном за счет выхода молекул NO при разложении комплекса в физиологических условиях (табл. 1). В качестве соединения сравнения мы использовали известный сосудорасширяющий препарат нитроглицерин, применяемый в настоящее время в клинике и имеющий выраженные побочные эффекты. Наше исследование показало, что нитроглицерин в дозе 18 мг/кг имеет сходный с соединением I характер действия, однако в дозе 36 мг/кг значительно повышает интенсивность процесса перекисного окисления липидов (табл. 1).

Полученные результаты исследования позволяют рекомендовать соединение I для дальнейших

исследований как имеющее терапевтический потенциал для лечения ССЗ.

Таблица 1. Оценка антиоксидантного эффекта терапии соединением I и нитроглицерином мышей с моделью кардиотоксичности, вызванной AZM (определение интенсивности перекисного окисления липидов в гомогенатах печени).

	Концентрация ТБК-АП, мкМ/мг белка
Контрольная группа	0.09±0.01
Группа AZM без терапии	0.19±0.01 ^{###}
Группа AZM + соединение I, 36 мг/кг	0.23±0.01 ^{*,###}
Группа AZM + соединение I, 18 мг/кг	0.09±0.01 ^{***,#}
Группа AZM + нитроглицерин, 36 мг/кг	0.28±0.02 ^{***,###}
Группа AZM + нитроглицерин, 18 мг/кг	0.09±0.01 ^{***,#}

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 относительно группы мышей AZM без терапии; # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001 относительно контрольной группы.

Изучение биологической активности комплекса I поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 22-24-00764). Синтез исследуемого комплекса поддержан Государственным заданием [№ АААА-А19-119071890015–6].

Литература

1. *Shaito A., Aramouni K., Assaf R., Parenti A., Orekhov A., Yazbi A.E., Pintus G., Eid A.H.* Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases // *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022. V. 27(3). P. 105.
2. *Farah C., Michel L., Balligand J.L.* Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease // *Nat Rev Cardiol*. 2018. V. 15(5). P. 292-316.
3. *Zhuge Z., McCann Haworth S., Nihlén C., Carvalho L.R.R.A., Heuser S.K., Kleschyov A.L., Nasiell J., Cortese-Krott M.M., Weitzberg E., Lundberg J.O., Carlström M.* Red blood cells from endothelial nitric oxide synthase-deficient mice induce vascular dysfunction involving oxidative stress and endothelial arginase I // *Redox Biol*. 2023. V. 60:102612.
4. *Sanina N.A., Syrtsova L.A., Shkondina N.I., Rudneva T.N., Malkova E.S., Bazanov T.A., Kotel'nikov A.I., Aldoshin S.M.* Reactions of sulfur-nitrosyl iron complexes of "g=2.03" family with hemoglobin (Hb): kinetics of Hb-NO formation in aqueous solutions // *Nitric Oxide*. 2007. V 16(2). P. 181-8.
5. *Шматко Н.И.* Катионные динитрозильные комплексы железа с тиомочевинной и ее производными – новые доноры оксида азота: дис. канд. хим. наук. – Черноголовка, 2017. С. 1-158.
6. *Atli O., Ilgin S., Altuntas H., Burukoglu D.* Evaluation of azithromycin induced cardiotoxicity in rats // *Int J Clin Exp Med*. 2015. V. 8 (3). P. 3681-3690.
7. *Санина Н.А., Серебрякова Л.И., Шульженко В.С., Писаренко О.И., Руднева Т.Н., Алдошин С.М.* Патент на изобретение № 2460531. Применение биядерного сера-нитрозильного комплекса железа катионного типа в качестве вазодилаторного лекарственного средства, 2012.
8. *Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.* Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal Biochem*. 1979. V. 95 (2). P. 351-358.

УДК 620.3

Липосомальная блокада системы мононуклеарных фагоцитов улучшает фармакокинетику полимерных наночастиц

В.И. Родионов^{1,2}, А.Б. Миркасымов², С.М. Деев²

¹ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (Московский инженерно-физический институт)

² Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Одним из основных направлений современной медицины являются наночастицы (НЧ) [1]. Наноагенты позволяют решить множество проблем, с которыми сталкиваются лекарства. Среди таких проблем можно выделить низкую растворимость и токсичность [2]. Помимо этого, наночастицы

обеспечивают эффективную адресную доставку и возможность контролируемого высвобождения лекарств [3]. Однако, попадая в организм, НЧ подвергаются распознаванию и поглощению клетками системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ). Сам термин СМФ охватывает фагоциты различных органов, в первую очередь, макрофаги печени и селезенки, представляющих первичный барьер, с которым сталкиваются наноагенты при внутривенном введении. Таким образом, циркуляция наночастиц в кровотоке и накопление в тканях-мишенях значительно снижается из-за поглощения клетками СМФ. Из литературы известно, что в среднем лишь 0,7% вводимых внутривенно НЧ достигают опухоли в организме [4]. Блокада СМФ малотоксичными «блокирующими» агентами позволяет временно снизить фагоцитарную активность макрофагов, тем самым продлевая циркуляцию частиц в кровотоке и способствуя их более эффективному накоплению в патологических тканях.

В данной работе на мышах исследовалась блокада СМФ. В качестве «блокирующего» агента использовались липосомы, которые обладают хорошей биосовместимостью, что является важным, так как метод требует введения большой дозы блокатора. Также были использованы наночастицы полимолочно-гликолевой кислоты с красителем нильским синим (PLGA-NB), циркуляция которых в кровотоке изучалась посредством их флуоресценции. В результате блокада СМФ липосомами позволила продлить циркуляцию полимерных наночастиц в кровотоке более чем в 4 раза (рис. 1).

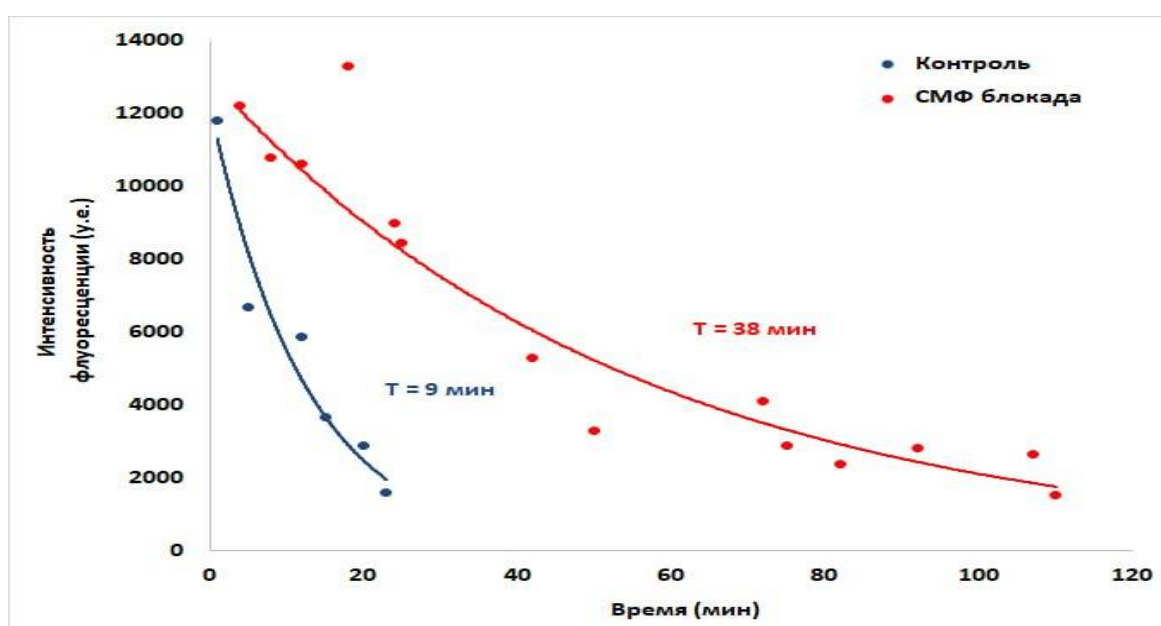


Рисунок 1. Циркуляция наночастиц PLGA в кровотоке.

Литература

1. Engineering precision nanoparticles for drug delivery / M.J. Mitchell, M.M. Billingsley, R.M. Haley [и др.] // Nature reviews. Drug discovery. – 2021. – Т. 20, №2. С.101–124.
2. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date / D. Bobo, K.J. Robinson, J. Islam [и др.] // Pharmaceutical research. – 2016. – Т. 33, №10. – С.2373–2387.
3. Development of nanoparticle-delivery systems for antiviral agents: A review / R. Delshadi, A. Bahrami, D.J. McClements [и др.] // Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. – 2021. – Т. 331. – С.30–44.
4. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem / H.H. Gustafson, D. Holt-Casper, D.W. Grainger, H. Ghandehari // Nano today. – 2015. – Т. 10, №4. – С.487–510

УДК 620.3

Разработка метода синтеза липидных наночастиц и исследование их свойств

О.В. Дорож¹, Р.О. Меликов^{1,2}, Е.А. Егорова², И.А. Сидоров²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Научно-технологический университет «Сириус»

Липидные наночастицы (ЛНЧ) – стабильные наноструктуры, состоящие из двойного липидного слоя и обладающие свойством инкапсуляции нуклеиновых кислот (НК), включая мРНК, защищающие их от деградации и усиливающие поглощение клетками. Благодаря этому свойству они применяются для доставки противоопухолевых препаратов [1], а также в составе мРНК-вакцин [2].

Несмотря на то, что на сегодняшний день для синтеза ЛНЧ разработан ряд методов, включая методы микроэмульсии, гомогенизации липидов под высоким давлением и др., все они обладают общими недостатками – высокой полидисперсностью образуемых частиц, низким процентом инкапсуляции и т.п., что ограничивает их практическое применение [3,4]. В известной степени этих недостатков лишены проточные системы, например, основанные на получении ЛНЧ в турбулентном потоке “Y”-образного канала в микрофлюидном чипе (рис. 1,а) [5].

Для генерации ЛНЧ в данной работе был разработан метод с использованием системы микродозирования производства ООО “Abisense” (рис. 1,б) и микрофлюидных чипов Fluidic 187 [6]. В эксперименте было использовано два различных канала для подачи водной (липидной) и органической (олигонуклеотиды в спирте) фаз, которые далее смешивались в турбулентном потоке с образованием монодисперсных частиц требуемого размера.

Целью работы являлось получение частиц с заданным диаметром и узким распределением по размерам. Для этого была проведена оптимизация условий получения частиц, в том числе путем подбора скорости подачи реагентов каждой из фаз (органической и водной) и их состава. Благодаря подобранным параметрам были получены ЛНЧ и проведено исследование их коллоидно-химических характеристик методом динамического светорассеяния на приборе “Photocor Compact – Z” российского производства. В частности, в оптимизированных условиях синтеза средний гидродинамический размер составил около 80 нм (с коэффициентом вариации 10 %) в сочетании с высокой эффективностью инкапсуляции олигонуклеотидов (более 90%).

Таким образом, разработанный метод синтеза ЛНЧ позволяет получать частицы с контролируемыми размерами и высокой монодисперсностью, что обеспечивает возможность их применения для трансфекции клеток различными генетическими конструкциями и создания вакцин.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования, соглашение 075-03-2023-106 (проект 0714-2020-0004). Авторы выражают благодарность компании ООО “Abisense” за предоставленное оборудование.

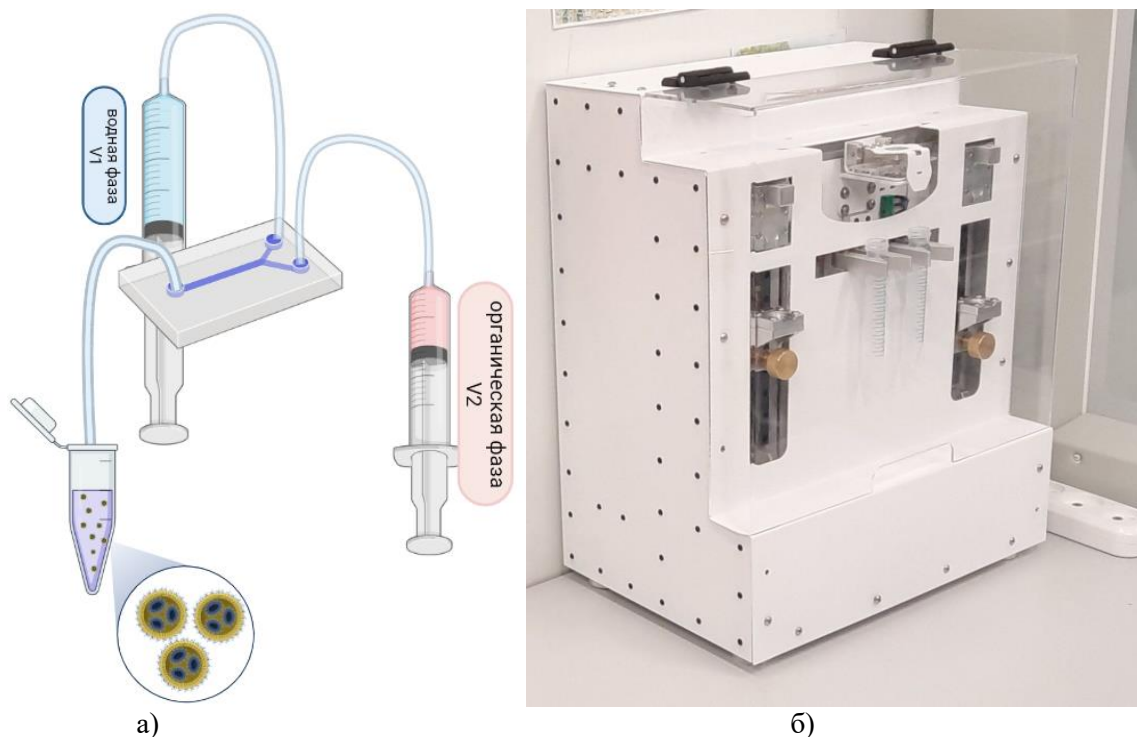


Рисунок 1. а) Схема получения ЛНЧ; б) Установка для получения ЛНЧ (микрофлюидный чип, подключенный к двум шприцевым насосам)

Литература

1. Akinc A., Battaglia G. (2013). Exploiting endocytosis for nanomedicines. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 5(9)
2. Norbert Pardi, Michael J. Hogan, Frederick W. Porter, Drew Weissman, mRNA vaccines — a new era in vaccinology, *Nature Reviews Drug Discovery* volume 17, pages 261–279 (2018)
3. Karimi M., Ghasemi, A., Sahandi Zangabad, P. (2016a). Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chemical Society Reviews*, 45(5), 1457-1501.
4. Karimi M., Sahandi Zangabad, P., Ghasemi A., Amiri M., Bahrami S., Malekzad H., Hamblin M.R. (2016b). Magnetic nanoparticles for drug delivery: A versatile platform for controlled release. *Journal of Controlled Release*, 209, 76-89.
5. Turánek J., Kotouček J. Modification of liposomal surface by polysaccharides: Preparation, characterization, and application for drug targeting in *Functional Polysaccharides for Biomedical Applications*, 2019
6. <https://www.microfluidic-chipshop.com/catalogue/microfluidic-chips/polymer-chips/micro-mixer/micro-mixer-fluidic-187>

УДК 61:620.3

Разработка микросубстратов, состоящих из нановолокон, для эффективного культивирования клеток

М.А. Кулиева¹, А.С. Богданова^{1,2}, Д.В. Клинов^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

За последние несколько лет достигнут значительный прогресс в разработке различных методов клеточной терапии, а также улучшенных подходов к регенерации поврежденных тканей. В этих областях существует необходимость эффективной генерации большого количества клеток в ограниченном пространстве и при ограниченных ресурсах [1, 4]. Основная проблема в количественном увеличении выращенной культуры связана с адгезивными клетками, которым необходимо прикрепляться к поверхности, чтобы оставаться жизнеспособными и размножаться [3].

В данной работе были разработаны микросубстраты, состоящие из нановолокон, на которые будет высеваться клеточная культура. Преимуществом таких микросубстратов является увеличение площади поверхности микросубстрата за счет использования матрикса из нановолокон при использовании меньшего количества питательной среды [2]. Такие твердофазные носители эффективны, так как позволяют выращивать клетки не только на поверхности, но и внутри, тем самым увеличивая конечную концентрацию клеток. Основным преимуществом является возможность доставки клеточной культуры в прикрепленном виде к поврежденным участкам для использования в клеточной терапии.

В данной работе получены матриксы из нановолокон методом электроспиннинга из раствора смеси полилактид (ПЛА) (REC, Россия), желатин (Sigma-Aldrich, США) в гексафторизопропанол (HFIP) (P&M Invest, Россия) (ПЛА: желатин = 7:3, 100 мг/мл). Электроспиннинг является простым методом получения тонких полимерных волокон с диаметрами от нанометров до микрон, что делает его эффективным инструментом в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Электроспиннинг выполнялся на установке the Nanofiber Electrospinning Unit (Tong Li Tech, Шеньжень, Китай), снабжённой шприцевым насосом (KD Scientific, Холлистон, США).

Множество тонких полимерных волокон, осажденных в процессе электроспиннинга, формируют матрикс. За счет волокнистой структуры матриксы обладают большой площадью поверхности, благодаря чему получили большое распространение в качестве субстратов для культивирования клеток и основы для тканеинженерных конструкций, поскольку волокнистая структура материала, полученного электроспиннингом, может имитировать естественный внеклеточный матрикс тканей, а пористость обеспечивает транспорт питательных веществ. Эти свойства используются для разработки микросубстратов.

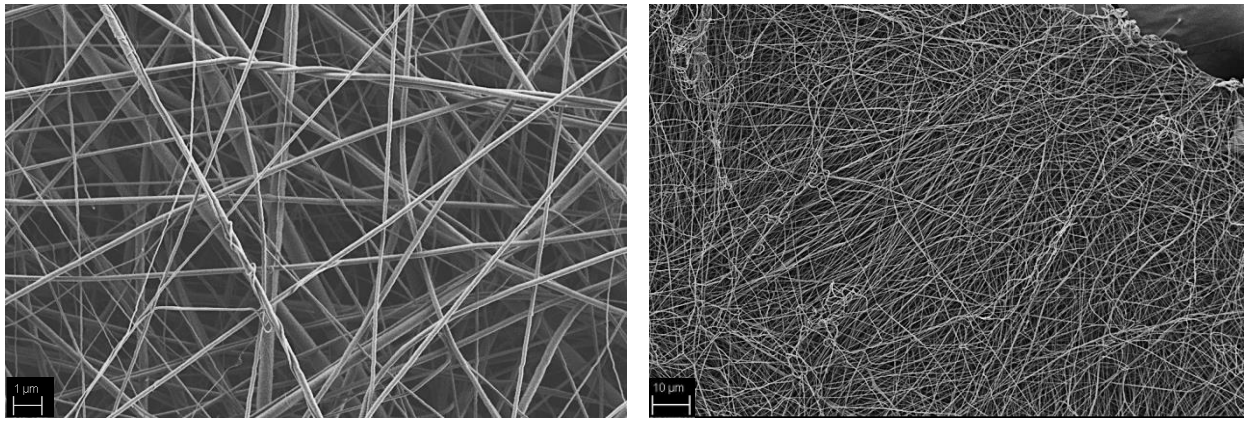


Рисунок 1. СЭМ матрикса, полученного методом электроспиннинга из раствора смеси ПЛА-желатин

Волокна и матриксы, полученные методом электроспиннинга из раствора смеси полилактид-желатин в HFIP, были исследованы с помощью микроскопа Zeiss Merlin, оснащенного электронной оптикой Gemini II (Zeiss, Germany) (рис. 1). Получены гладкие цилиндрические волокна со средним диаметром: $d = (0,34 \pm 0,07)$ мкм.

Для получения микросубстратов определенной формы разрезали полученный матрикс с помощью лазерной гравировальной машины LaserPro Spirit GLS (GSS, Тайвань), оснащенной инфракрасным CO₂ лазером мощностью 100 Вт (рис. 2).

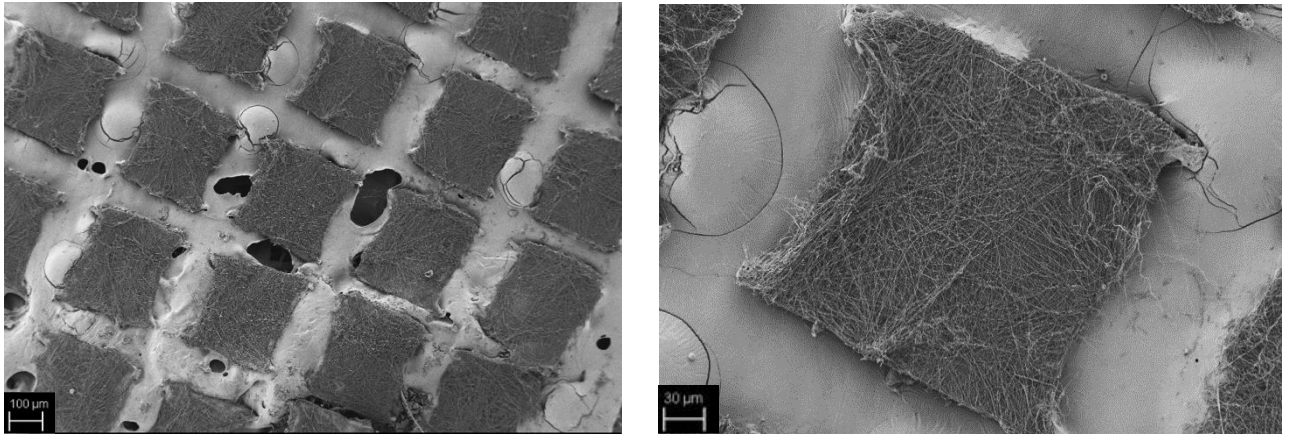


Рисунок 2. СЭМ матриксов, полученных после лазерной гравировки с улучшенными параметрами.

В результате работы были получены микросубстраты в виде квадратов матрикса размером 300×300 мкм. Произведен подбор параметров лазерной гравировки для создания микросубстратов. Методом сканирующей электронной микроскопии исследована морфология матриксов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание) № 075-03-2023-106, номер проекта FSMG-2023-0015.

Литература

1. *Bellani C.F. et al.* Scale-Up Technologies for the Manufacture of Adherent Cells // *Frontiers in Nutrition*. Frontiers Media S.A., 2020. Vol. 7.
2. *Rafiq Q.A. et al.* 4 Scalable Manufacture for Cell Therapy Needs. 2016.
3. *Derakhti S. et al.* Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review // *Materials Science and Engineering C*. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 103.
4. *Bodiou V., Moutsatsou P., Post M.J.* Microcarriers for Upscaling Cultured Meat Production // *Frontiers in Nutrition*. Frontiers Media S.A., 2020. Vol. 7.

УДК 535.371

Создание покрытия из гиалуроновой кислоты на поверхности наночастиц с антистоксовой флуоресценцией

Для проведения биомедицинских исследований широкое применение нашли нанокристаллы с антистоксовой флуоресценцией (НАФ), представляющие собой неорганическую кристаллическую матрицу тетрафториттриата натрия NaYF_4 , легированную трехвалентными ионами редкоземельных металлов – иттербия, эрбия или тулия ($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ или Tm^{3+}). Такой вид наночастиц обладает способностью к апконверсии – преобразованию низкоэнергетических фотонов в фотоны более высокой энергии посредством двухфотонного механизма [1]. Кроме того, НАФ возбуждаются спектрально выгодным источником света (975 нм), лежащим в «окне прозрачности» биологической ткани (600-1300 нм), в связи с чем происходит глубокое проникновение света в ткань с минимальным поглощением и рассеянием [2]. Однако гидрофобный характер поверхности частиц требует ее модификации с целью создания биосовместимых, коллоидно-стабильных и не вызывающих иммунного ответа организма реагентов.

Цель работы – разработка способов модификации НАФ с использованием гиалуроновой кислоты (ГК) для получения биосовместимых реагентов. ГК, структурная формула которой изображена на рисунке 1, представляет собой отрицательно заряженный полисахарид, для которого характерна высокая гидрофильность, биоразлагаемость и биосовместимость, а также низкая токсичность.

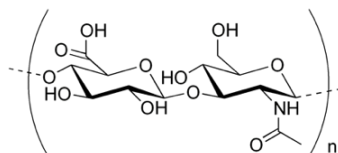


Рисунок 1. Структурная формула гиалуроновой кислоты

Перед выполнением модификации НАФ с помощью ГК проводили гидрофилизацию частиц с помощью высокомолекулярного аминсоединения полиэтиленimina (ПЭИ) и низкомолекулярных аминов: этилендиамина (ЭДА), гексаметилендиамина (ГМДА) и аминокaproновой кислоты (АКК) с использованием тетраметиламмоний гидроксида (ТМАГ). Модификацию НАФ с ГК проводили двумя способами: адсорбцией с добавлением сшивающих агентов (ZnCl_2 и 1,4-бутандиол диглицидилового эфира (БДДЭ)) и формированием ковалентной связи между аминсоединением и ГК с помощью карбодимидной активации. Общая схема процесса получения биосовместимых реагентов представлена на рисунке 2.

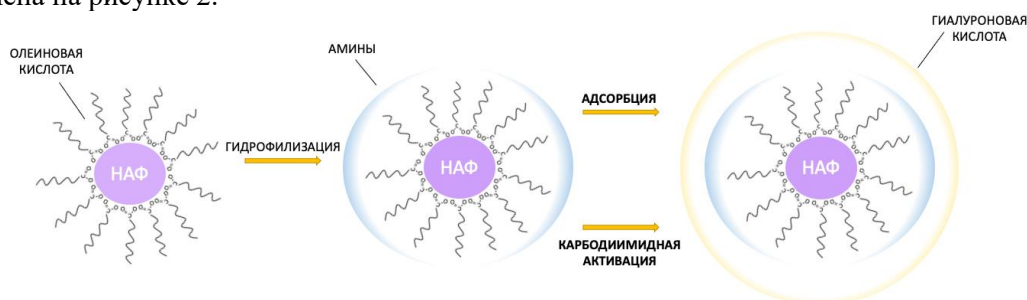


Рисунок 2. Схема двухстадийной модификации НАФ

Для оценки эффективности включения ГК в поверхность НАФ был разработан метод введения родамина Б (1 мг/мл) в гиалуроновое покрытие. На рисунке 3 представлены результаты флуоресцентного сигнала от родамина Б, введенного в образцы НАФ-ТМАГ (а) и НАФ-ПЭИ (б) с различными сшивающими агентами. Из приведенных гистограмм видно, что эффективная адсорбция ГК наблюдалась в образцах НАФ-ТМАГ-АКК-ГК+/-, НАФ-ТМАГ-АКК-ГК-КДИ и НАФ-ПЭИ-ГК-КДИ. Кроме того, полученные дисперсии имеют узкое распределение частиц по размерам и высокий дзета-потенциал, о чем свидетельствуют изображенные на рисунке 4 гистограммы.

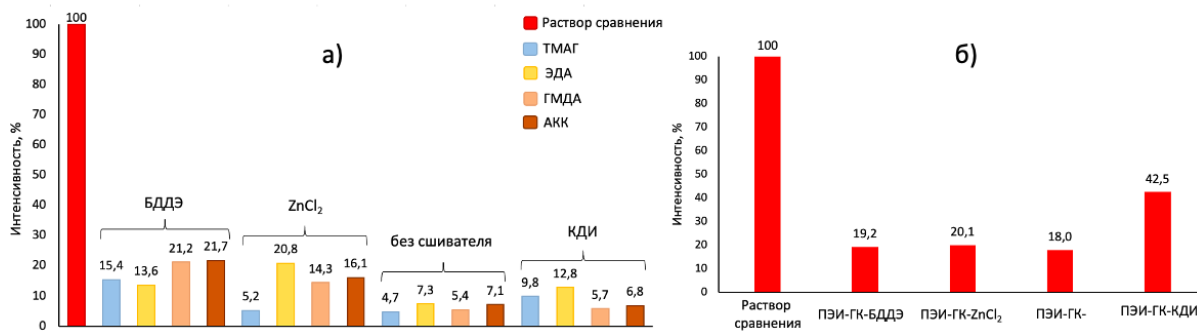


Рисунок 3. Введенного в пробы НАФ-ТМАГ (а) и НАФ-ПЭИ (б)

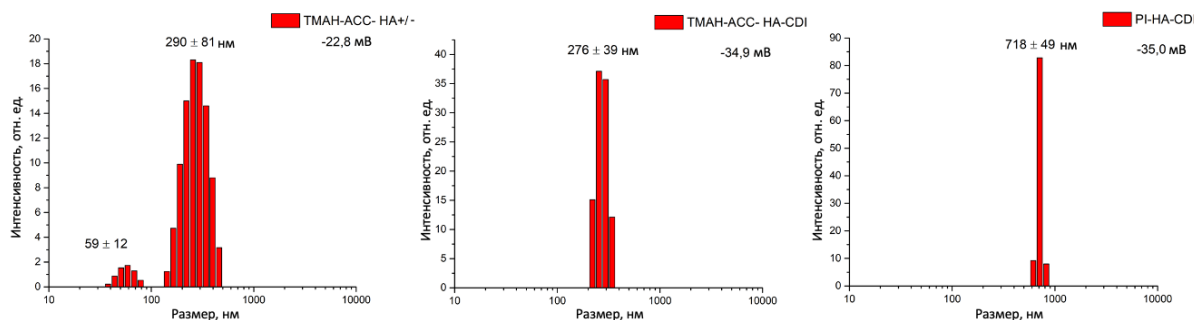


Рисунок 4. Гистограммы распределения наночастиц по размерам и дзета-потенциал образцов НАФ-ТМАГ-АКК-ГК+/-, НАФ-ТМАГ-АКК-ГК-КДИ и НАФ-ПЭИ-ГК-КДИ

Полученные образцы представляют интерес для визуализации опухолевой ткани и области воспаления, что требует их продолжительной циркуляции в кровеносной системе. Длительность циркуляции зависит от адсорбции белков крови, которая должна быть минимальной. Влияние покрытия из ГК на степень адсорбции белков изучали на примере адсорбции бычьего сывороточного альбумина (БСА). К 250 мкл (0,8 мг/мл) образцов НАФ добавляли 150 мкл (3 мг/мл) БСА, инкубировали при перемешивании в течение 1 часа при 37 °С, затем центрифугировали. В надосадочной жидкости определяли количество несвязанного белка по методу Брэдфорда. Из данных, приведенных на рисунке 5, видно, что создание покрытия из ГК приводит к увеличению количества белка в супернатанте, т.е. снижению адсорбции на поверхности НАФ, модифицированных ГК.

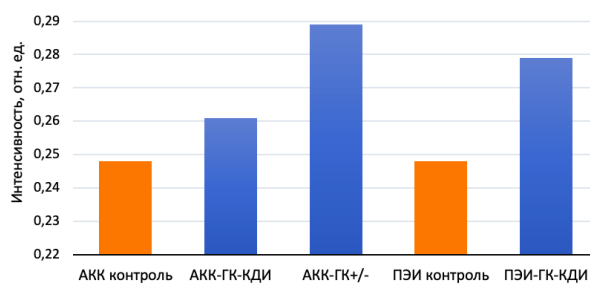


Рисунок 5. Количество белка БСА в надосадочной жидкости образцов АКК-ГК-КДИ, АКК-ГК+/-, ПЭИ-ГК-КДИ и контрольных образцов без ГК после их центрифугирования

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ в рамках проекта № 18-79-10198.

Литература

1. *Chen G., Qiu H., Prasad P. N., Chen X.* Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics // *Chem. Rev.* 2014. V.114. P. 5161–5214.
2. *Генералова А.Н., Zubov B.П., Хайдуков Е.В.* Нанокристаллы с антистоксовой флуоресценцией на пути в медицину – М.: Природа, 2016. №. 11. С. 24-32.

Дефенсин NaD1 из цветков табака *Nicotiana glauca* действует против резистентных штаммов *Candida albicans***О.В. Шевченко^{1,2}, Овчинникова Т.В.^{2,3}, Е.И. Финкина²**¹«МИРЭА – Российский технологический университет».²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

В последнее время микозы, вызванные патогенными штаммами грибов, стали важной клинической проблемой. Диссеминированные грибковые заболевания характеризуются тяжелыми клиническими проявлениями и высокой летальностью, особенно у людей с иммунодефицитными состояниями, онкологическими и хроническими респираторными заболеваниями. Из всех инвазивных инфекций 90% вызваны условно-патогенными грибами рода *Candida*. Среди различных видов данного гриба *Candida albicans* является наиболее распространенной причиной кандидоза. Стоит отметить, что в клинической практике используется весьма ограниченный список антимикотиков, которые характеризуются высокой токсичностью. Особую обеспокоенность вызывает появление штаммов грибов, резистентных и мультирезистентных к конвенциональным противогрибковым препаратам [1]. Все это в совокупности делает крайне актуальной задачей поиск новых противогрибковых средств. Перспективными объектами для исследований являются растительные дефенсины, которые эффективно подавляют рост патогенных для человека грибов, характеризуются высокой устойчивостью и низкой токсичностью [2].

Нами в качестве объекта исследования был выбран дефенсин NaD1 из цветков табака *Nicotiana glauca*. Показано, что NaD1 обладает выраженной противогрибковой активностью, характеризуется токсичностью в отношении различных опухолевых клеток, но не вызывает гемолиз эритроцитов [3]. Механизм действия данного дефенсина связан со способностью специфически взаимодействовать с такими компонентами клеточных мембран, как фосфатидные кислоты и фосфатидилинозит-4,5-дифосфат [4]. В данной работе мы провели исследование противогрибковой активности NaD1 в отношении ряда резистентных штаммов *Candida albicans*, а также изучили его действие в комбинации с конвенциональными антимикотиками трех групп. В работе были использованы вориконазол из группы производных триазола и амфотерицин В из группы полиенов, которые действуют на клеточную мембрану грибов, ингибируя различные стадии биосинтеза эргостерола, а также эхинокандиновый антимикотик каспофунгин, ингибирующий синтез компонента клеточной стенки грибов β -(1,3)-D-глюкана.

Рекомбинантный NaD1 был получен биотехнологическим способом путем гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli* в составе гибридного белка с октагистидиновой последовательностью и тиоредоксином А в качестве белка-партнера. Клетки *E. coli* штамма BL-21(DE3) были трансформированы полученной ранее плазмидой pET-His8-TrxL-NaD1. Препаративную экспрессию проводили, выращивая трансформированные клетки в среде LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 20 мМ глюкозы и используя в качестве индуктора 0,2 мМ ИПТГ (изопропилтио- β -D-галактопиранозид). Выделение и очистку рекомбинантного дефенсина осуществляли в несколько этапов из растворимой фракции клеточного белка. Сначала выделяли гибридный белок His8-TrxL-NaD1, используя металлохелатную хроматографию в нативных условиях и последующий диализ. Далее целевой пептид получали из гибридного белка, проводя расщепление бромцианом в кислой среде по искусственно введенному остатку метионина. Очистку дефенсина NaD1 осуществляли с помощью повторной металлохелатной хроматографии и двухстадийной обращенно-фазовой ВЭЖХ. Гомогенность полученного препарата и его идентичность природному пептиду были подтверждены с помощью SDS-электрофореза, MALDI-TOF масс-спектрометрии и КД-спектроскопии.

Противогрибковую активность NaD1 определяли в отношении ряда чувствительных и резистентных штаммов *C. albicans*, выделенных на базе МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского из клинических изолятов пациентов с ВИЧ-инфекцией. Резистентные штаммы *C. albicans* (8.2, 9.1, 14.1 и 1.1) характеризовались выраженным снижением чувствительности к препаратам группы триазолов и двукратным повышением минимальных ингибирующих концентраций (МИК) препаратов групп эхинокандинов и полиенов [5]. Было показано, что в клетках данных штаммов повышены уровни экспрессии гена ERG11, кодирующего ланостерол-14 α -диметилазу, который участвует в биосинтезе эргостерола и является мишенью действия триазолов, а также генов эффлюксных переносчиков CDR1, CDR2 и MDR1, способных удалять из клетки противогрибковые препараты [5]. Исследование проводили методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде в 96-луночные планшеты, используя клеточные культуры со стартовой концентрацией 10⁵ клеток/мл. Рост *C. albicans*

оценивали под микроскопом, а также по измерению оптической плотности культуры в лунках при помощи планшетного фотометра. Для оценки фунгицидного действия пептида (МФК) содержимое лунок планшета после определения МИК высевали на чашки с агаром Сабура и глюкозой. Проведенное исследование показало, что NaD1 подавляет рост всех чувствительных и резистентных штаммов *C. albicans* с равной эффективностью (МИК₁₀₀ 12,5 мМ). Микроскопический анализ показал, что дефенсин не только ингибирует рост и размножение грибов, но и вызывает лизис клеток. Пересев содержимого лунок на чашки с питательной средой выявил, что NaD1 оказывает фунгицидное действие в отношении всех использованных штаммов грибов также в концентрации 12,5 мМ.

Методом «шахматной доски» проводилось тестирование действия рекомбинантного NaD1 в комбинации с конвенциональными антимикотиками трех групп в отношении резистентных штаммов *C. albicans*. Вещества для этих экспериментов использовались в двухкратных разведениях, начиная с МИК₁₀₀. Для оценки типа совместного действия веществ рассчитывался индекс фракционной ингибирующей концентрации (иФИК). Проведенное исследование показало, что NaD1 в смеси с амфотерицином В, обладающим фунгицидным действием, характеризуются независимым противогрибковым действием (минимальные значения индекса для комбинаций $1 < \text{иФИК} \leq 2$). В случае комбинаций NaD1 с вориконазолом, который действует фунгистатически, наблюдалось аддитивное действие (минимальные значения индекса для комбинаций $0,5 < \text{иФИК} \leq 1$). При оценке же совместного действия NaD1 и каспофунгина, действующего фунгицидно, были получены различные результаты для разных резистентных штаммов *C. albicans*. Для штаммов 8.2 и 1.1 минимальное значение иФИК для всех комбинаций составило 1, что соответствует аддитивному действию антимикотиков. Для штамма 9.1 для целого ряда комбинаций и штамма 14.1 для одной комбинации веществ были установлены значения $\text{иФИК} \leq 0,5$, что указывает на синергическое действие компонентов. Фунгицидное действие не наблюдалось для комбинаций с иФИК менее 0,5, но было обнаружено для ряда комбинаций с аддитивным действием и иФИК 1-0,51. Дефенсин табака NaD1 был скомбинирован также с другим растительным дефенсином – Psd2 из семян гороха, который действует фунгистатически (МИК₅₀ 25-50 мМ). Механизм действия Psd2 на сегодняшний день еще не установлен. Неожиданным оказался тот факт, что два дефенсина действовали в антагонизме друг с другом ($\text{иФИК} > 2$), что может указывать на конкурентное связывание с одной и той же мишенью действия.

Цитотоксические свойства NaD1 табака исследовали на мононуклеарных клетках периферической крови (РВМС) методом серийных разведений в 96-луночных планшетах. Жизнеспособность клеток оценивалась с помощью теста с резазурином, который в живых клетках превращается в флуоресцирующий резорурфин. Результаты продемонстрировали отсутствие токсичности пептида в концентрации 12,5 мМ и незначительное снижение жизнеспособности клеток (на 12%) в присутствии NaD1 в концентрации 25 мМ.

Таким образом, было показано, что дефенсин из цветков табака NaD1 обладает противогрибковой активностью в отношении резистентных штаммов *C. albicans*, характеризуется фунгицидным действием и работает в синергизме с препаратом группы эхинокандинов – каспофунгином. Данный пептид является перспективным объектом для дальнейшего исследования в качестве возможного прототипа новых противогрибковых препаратов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 22-25-00654.

Литература

1. Pristov K.E., Ghannoum M.A. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide //Clinical Microbiology and Infection. – 2019. – V. 25. – №. 7. – P. 792-798.
2. Finkina E.I., Ovchinnikova T.V. Plant defensins: Structure, functions, biosynthesis, and the role in the immune response //Russian journal of bioorganic chemistry. – 2018. – V. 44. – P. 261-278.
3. Kerenga B.K. et al. Salt-tolerant antifungal and antibacterial activities of the corn defensin ZmD32 //Frontiers in Microbiology. – 2019. – V. 10. – P. 795.
4. Payne J.E. et al. The plant defensin NaD1 introduces membrane disorder through a specific interaction with the lipid, phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2016. – V. 1858. – №. 6. – P. 1099-1109.
5. Воронаев А.Д. и др. Экспрессия CDR1, CDR2, MDR1 и ERG11 у устойчивых к азолам штаммов Candida albicans, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в городе Москве //Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12. – №. 5. – С. 929-937.

Исследование влияния нитрозильного комплекса железа с пеницилламиновым лигандом на фосфолипидные мембраны и перекисное окисление липидов спектрально-люминесцентными методами

М.А. Савушкин¹, Д.А. Полетаева², Ю.В. Солдатова², Н.А. Санина^{1,2} И.И. Файнгольд²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

²Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН

Нитрозильные комплексы железа (НКЖ) привлекают внимание широкого круга исследователей, в том числе в области медицинской химии. НКЖ обладают вазодилаторной и гипотензивной активностью, способны подавлять агрегацию тромбоцитов и инициировать синтез стресс-белков, усиливающих защитные системы организма, при этом они, наряду с нитрозотиолами являются стабильными биорезервуарами NO. В настоящей работе исследуется катионный биядерный тетранитрозильный комплекс железа с пеницилламиновым лигандом $[\text{Fe}_2(\text{SC}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{NH}_3)\text{COOH})_2(\text{NO})_4]\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ТНКЖ-ПА) [1].

Исследования проводили на модельных мембранах фосфатидилхолиновых липосом. L- α -фосфатидилхолин из яичного желтка был приобретен в Sigma-Aldrich. Малые моноламеллярные фосфолипидные липосомы готовили по методу ультразвуковой обработки больших мультиламеллярных липосом [2]. Методом динамического рассеяния света с использованием установки Photocor Compact определили размер липосом фосфатидилхолина, он составил 26 нм. Взаимодействие ТНКЖ-ПА с мембраной липосом изучали методом люминесцентных зондов. В качестве люминесцентных зондов в работе использовали: эозин Y и пирен. С помощью спектрофлуориметра Agilent Cary Eclipse регистрировали спектры флуоресценции зондов в водных растворах и в составе липосом. Было показано, что комплекс ТНКЖ-ПА является тушителем триплетных возбужденных состояний зондов. Определены константы Штерна-Фольмера в водных растворах ($K_{sv, \text{эозин/буфер}} = 0.3 \times 10^4 \text{M}^{-1}$) и в структуре мембран ($K_{sv, \text{эозин/мемб}} = 0.9 \times 10^4 \text{M}^{-1}$, $K_{sv, \text{пирен}} = 3.9 \times 10^4 \text{M}^{-1}$). Концентрационные зависимости тушения флуоресценции зонда эозина в водных буферных растворах отличаются от значений для липосом фосфатидилхолина, что указывает на эффективное взаимодействие комплекса ТНКЖ-ПА с мембраной в области полярных головок фосфолипидов. Действие НКЖ на перекисное окисление липидов (ПОЛ) изучали спектрофотометрическим методом определения содержания малонового диальдегида при спонтанном ПОЛ и методом люминол-зависимой хемилюминесценции при инициированном ПОЛ. Были определены значения IC50 для НКЖ при спонтанном и инициированном ПОЛ в гомогенатах тканей мышей *in vitro*.

Исследование влияния ТНКЖ-ПА на мембраны и перекисное окисление липидов выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00764). Синтез ТНКЖ-ПА выполнен по теме государственного задания № АААА-А19-119071890015-6.

Литература

1. Pokidova O.V., Kormukhina A.Y., Kotelnikov A.I., Rudneva T.N., Lyssenko K.A., Sanina N.A. *Inorganica Chim. Acta*, 2021, 524, 120453.
2. Van R.N., Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *Journal of immunological methods*, 1994, 174, 83-93.

Производные фторхинолона как основа препаратов для антибактериальной терапии на фоне коронавирусной инфекции

В.А. Дудина¹, Т.С. Ведехина², В.Б. Цветков², М.В. Малахова², А.М. Варижук², А.Ю. Лукин¹

¹ МИРЭА – Российский технологический университет

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства

Вспышка COVID-19, вызванная тяжелым острым респираторным синдромом коронавируса 2 (SARS-CoV-2), возникла одновременно с серьезной обеспокоенностью по поводу устойчивости к противомикробным препаратам. Основываясь на данных из серии случаев, разумно ожидать, что у заметного количества пациентов с тяжелой формой COVID-19 разовьются суперинфекции, чаще всего пневмония, вызванная внутрибольничными бактериями (*Staphylococcus aureus* (MSSA, MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*). В связи с этим необходимы исследования в области нацеленного поиска соединений с заданной специфичностью действия в отношении мишеней, относящихся к SARS-CoV-2 и сопутствующим инфекциям [1-4].

Данных о новых эффективных в отношении SARS-CoV-2 препаратах в настоящее время относительно мало, поэтому мы начали поиск с малых молекул с подтвержденной антибактериальной активностью.

Молекулы на основе хинолонов занимают огромную нишу в сфере противовирусной и антибактериальной терапии, что позволит применять их при лечении COVID-19 с сопутствующими бактериальными инфекциями [5,6]. В рамках данного исследования были выбраны 9-азаспиро-1-окса[5.5]ундекан производные фторхинолона (рис. 1) [7], обладающие большей активностью в отношении *Acinetobacter baumannii* (грамотрицательные бактерии) и *Bacillus cereus* (грамположительные бактерии) по сравнению с ципрофлоксацином. Также они показали активность в отношении *Staphylococcus aureus* и в некоторых случаях – против *Klebsiella pneumoniae*, но были менее эффективны, чем ципрофлоксацин.

Часто используемый подход для обнаружения лекарств от SARS-CoV-2 заключается в нацеливании на ферменты, участвующие в биологическом процессе, таком как процесс размножения. И в эту группу входят некоторые представители семейства неструктурных белков (nsp), в частности, папаиноподобная протеаза (PLpro, nsp3) [8]. Также хорошо известно, что в человеческом организме нет фермента, эквивалентного РНК-зависимой РНК-полимеразе (RdRp, nsp12), и это жизненно важный фермент для жизненного цикла вируса. Следовательно, он предоставляется хорошим кандидатом в качестве мишени для разработки противовирусных препаратов [9, 10]. Проведенное молекулярное моделирование с дальнейшим докингем на PLpro и RdRp (с использованием программы (ICM-Pro 3.86) и молекулярной динамики (с применением пакета программ Amber 20) показали высокое сродство у исследуемых производных фторхинолона к белкам-мишеням.

Для количественной оценки взаимодействия выбранных соединений с nsp3 и nsp12 использовали микроскопический термофорез (MST). По результатам исследования производные фторхинолона обладают высокой аффинностью к nsp3. Для nsp12 наблюдается аналогичная. Стоит отметить, что полученные с помощью микротермофореза данные хорошо коррелируют с результатами молекулярного докинга.

Чтобы оценить антибактериальный эффект производных фторхинолона в отношении микобактерий, мы использовали близкородственный к возбудителю туберкулеза штамм *M. smegmatis*, т.к. быстрее растет и не является патогенным. Ингибирующий эффект в объеме оценивали в диапазоне концентраций производных фторхинолона 2-256 мкМ. Практически для всех соединений наблюдался дозозависимый эффект.

Таким образом, выявлено, что производные фторхинолона обладают как антибактериальной, так и анти-SARS-CoV-2 активностью. Результаты работы открывают возможность получения новых терапевтических агентов и могут применяться для разработки лекарств двойного действия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-25-00420.

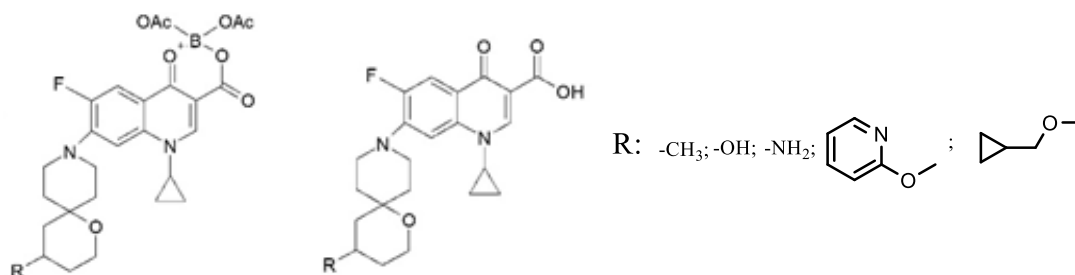


Рисунок 1. 9-Азаспиро-1-окса[5.5]ундекан производные фторхинолона, обладающие антибактериальной активностью.

Литература

1. Xing Q. *et al.* Precautions are needed for COVID-19 patients with coinfection of common respiratory pathogens // medRxiv 2020.02.29.20027698; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.29.20027698>.
2. Cucchiari D. *et al.* Pneumococcal superinfection in COVID-19 patients: A series of 5 cases // *Medicina Clinica*. 2020. V. 155. P. 502-505.
3. Toombs J.M. *et al.* Pneumococcal coinfection in COVID-19 patients // *J Med Virol*. 2021. V. 93. P. 177-179.
4. Visca D. *et al.* Tuberculosis and COVID-19 interaction: A review of biological, clinical and public health effects // *Pulmonology*. 2021. V. 27. P. 151-165.
5. Scroggs S.L.P. *et al.* Fluoroquinolone antibiotics exhibit low antiviral activity against SARS-CoV-2 and MERS-CoV // *Viruses*. 2021. V. 13. P. 8.
6. Selvam P. *et al.* Synthesis and antiviral studies of novel N-sulphonamidomethyl piperazinyl fluoroquinolones // *Indian J. Pharm. Sci.* 2009. V. 71. P. 432-436.
7. Lukin A. *et al.* Exploration of Spirocyclic Derivatives of Ciprofloxacin as Antibacterial Agents // *Molecules*. 2022. V. 27. P. 4864.
8. Klemm T. *et al.* Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2 // *Embo J*. 2020. V. 39. e106275
9. Gil Ayuso-Gontán C. *et al.* COVID-19: drug targets and potential treatments // *J Med Chem*. 2020. V. 63. P. 12359–12386.
10. Gao Y. *et al.* Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus // *Science*. 2020. V. 368. P. 779–782.

УДК 620.3

Metal-organic composites for nanomedicine obtained via photothermal approach

J. Barman^{1,2}, I.B. Belyaev^{2,3}, G.V. Tikhonowski³, I.V. Zelepukin^{2,3}, S.M. Deyev^{2,3}

¹Moscow Institute of Physics and Technology

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry

³Institute for Physics and Engineering in Biomedicine (PhysBio), National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute)

Metal-organic frameworks (MOFs), being long recognized only as materials for catalytic and gas storage applications, now attract a growing attention in the biomedical field. In particular, nanoparticles of MOFs are extensively used for efficient drug loading and delivery due to their especially high specific surface area and porosity [1].

Another prospective approach for integration of MOFs into nanomedicine is using them as coating (shell) for other functional nanoparticles [2]. This enables to create nanoagents for combined therapeutic and diagnostic purposes, having both the functionality of particles in the “core” and advantage of high surface loading provided by a MOF-shell. However, the precise control of MOF growth around single particles remains challenging to date and often results in particles above the limiting range of sizes for safe in vivo administration (< 300 nm).

The aim of this study is to obtain composite nanostructures MOFs/metal-based nanoparticles for application in chemo- and photo- therapy. For this, we chose widely recognized in drug delivery applications MIL-100(Fe) frameworks [1] and efficient light-to-heat energy converting TiN nanoparticles NPs [3]. The growth of MOFs on the surface of NPs was realized via photothermal excitation of core-material in solutions of MOF-precursors, that may be advantageous for providing a more homogeneous formulation of core-shell nanoparticles compared to direct heating of solution.

The obtained composites were characterized by scanning-electron microscopy coupled with energy-dispersive X-ray analyzer, which indicated the formation of individual quazi-spherical nanoparticles with the expected elementary composition. The presence of characteristic for TiN and MIL-100 chemical bonds was evaluated by Fourier-transform infrared spectroscopy. Light scattering experiments showed approximately 2-fold increase of particle hydrodynamic size from 65 nm (bare TiN NPs) upon MIL-100 growth. We also observed significant enhancement of loading capacity for oncotherapeutic drug, doxorubicin, in MOF-coated nanoparticles. Taken together, our results suggest successful synthesis of new nanocomposites promising for drug delivery.

In near future, the obtained nanocomposites will be evaluated in terms of photothermal efficiency, as well as in vitro toxicity tests will be conducted to optimize nanoparticles for in vivo use.

The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, agreement no. 075-15-2020-773.

References

1. Horcajada P. et al. Metal–organic frameworks in biomedicine //Chemical reviews. 2012. V. 112. N. 2. P. 1232-1268.
2. Gawande M.B., Goswami A., Asefa T., Guo H., Biradar, A.V., Peng D.L., Varma R. S. Core–shell nanoparticles: synthesis and applications in catalysis and electrocatalysis// Chemical Society Reviews. 2015. V. 44. N.21. P. 7540-7590.
3. Popov A.A. et al. Laser-synthesized TiN nanoparticles as promising plasmonic alternative for biomedical applications //Scientific reports. 2019. V. 9. N.1. P. 1194.

УДК 582.263, 631.4

Исследование влияния надосадочной жидкости в качестве среды выращивания на продуктивность и состав жирных кислот при культивировании микроводоросли

Chlorella vulgaris

В.С. Хлевная¹, К.В. Горин²

¹ФГБОУ ВО «Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова»

²НИЦ «Курчатовский институт»

Исследования микроводорослей – перспективное направление биотехнологии, переработка их биомассы позволяет получать множество продуктов, в том числе биотопливо, пищевые добавки и вещества для фармакологии. Кроме того, эти организмы потребляют CO₂ в существенно больших количествах, чем растения, что может помочь в решении проблемы чрезмерной эмиссии парниковых газов. В случае миксотрофного культивирования наблюдается как фиксация CO₂ воздуха, так и потребление органических примесей из воды, что позволяет реализовывать различные задачи по очистке бытовых сточных вод, городских талых вод, сточных вод сельского хозяйства и других. Широкое применение в промышленности культур микроводоросли хлорелла определяет необходимость поиска новых сред культивирования, таких как почвенные вытяжки. Нами предложено использование надосадочных жидкостей для культивирования микроводоросли, что позволит более экономно и эффективно расходовать водные и материальные ресурсы.

В данной работе объектом исследования была культура зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris* GKV 1 из коллекции НИЦ «Курчатовский институт».

Для первичного культивирования были использованы вытяжки из почв в качестве добавок к минеральной среде BBM. Наиболее распространенным способом применения почвенных вытяжек являются различные химические анализы. В последнее время распространение получили исследования в сфере использования вытяжек из почв как субстрата при культивировании микроводорослей [1]. По окончании опыта проводилось осаждение микроводорослей, а жидкая фаза, надосадок, отбиралась и использовалась для повторного культивирования.

После проведения повторного культивирования, биомасса осаждалась, лиофильно высушивалась. В дальнейшем высушенные микроводоросли использовались для проведения анализа метиловых эфиров жирных кислот, выделенных гексаном.

На рисунке 1 представлены кривые роста при культивировании микроводоросли *Chlorella vulgaris* на различных питательных средах.

Согласно полученным данным, наибольшая продуктивность наблюдалась при культивировании *Chlorella vulgaris* на надсадке вытяжки урбиквазизема березняка.

На рисунке 2 представлено распределение процентного содержания жирных кислот выделенных из биомассы *Chlorella vulgaris* после культивирования на различных средах.

Состав жирных кислот определяет качество биотоплива. Предпочтительно наличие предельных жирных кислот, среди непредельных жирных кислот более выгодно присутствие мононенасыщенных, чем полиненасыщенных. Жирнокислотный состав исследованных образцов сходен, наблюдается относительно повышенное содержание предельных жирных кислот в образце, выделенном из биомассы, выращенной на надсадке вытяжки урбиквазизема березняка.

Таким образом, предложенный нами метод показал свою эффективность и является перспективным. В дальнейшем он может быть предложен для проведения опытов на других видах микроводорослей и использоваться в биотехнологических целях.

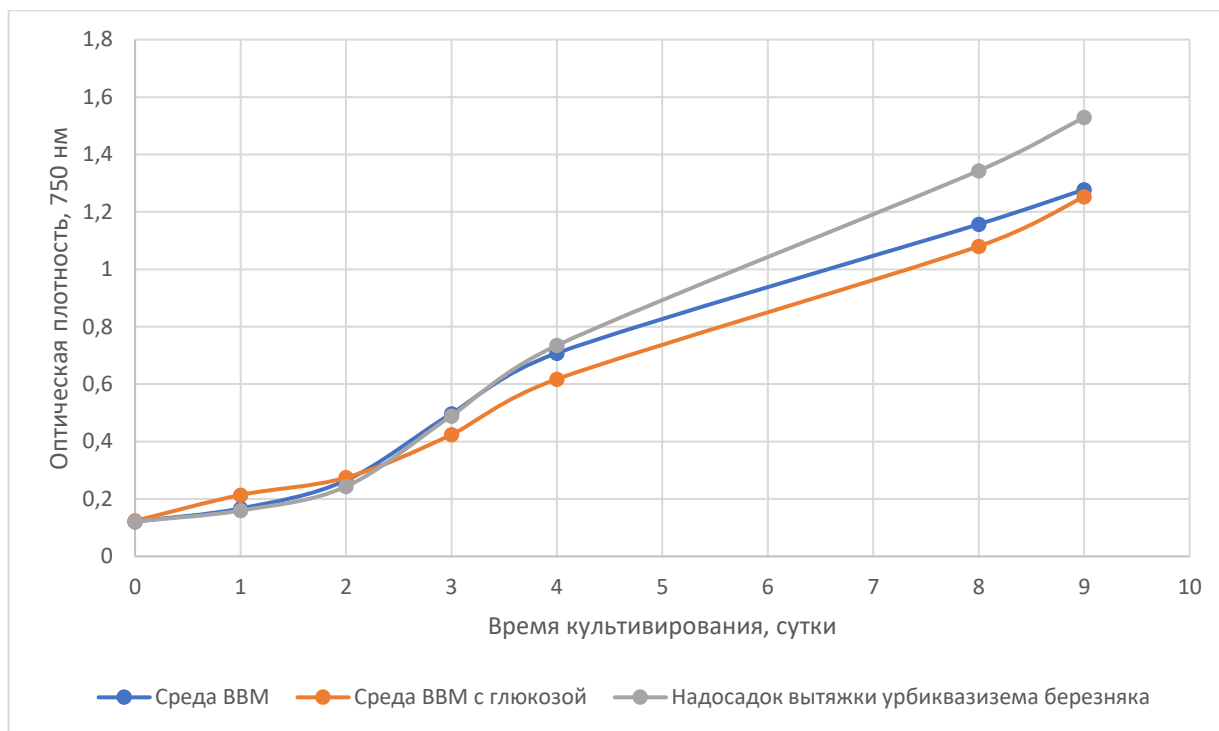


Рисунок 1. Кривые оптической плотности культивирования хлореллы.

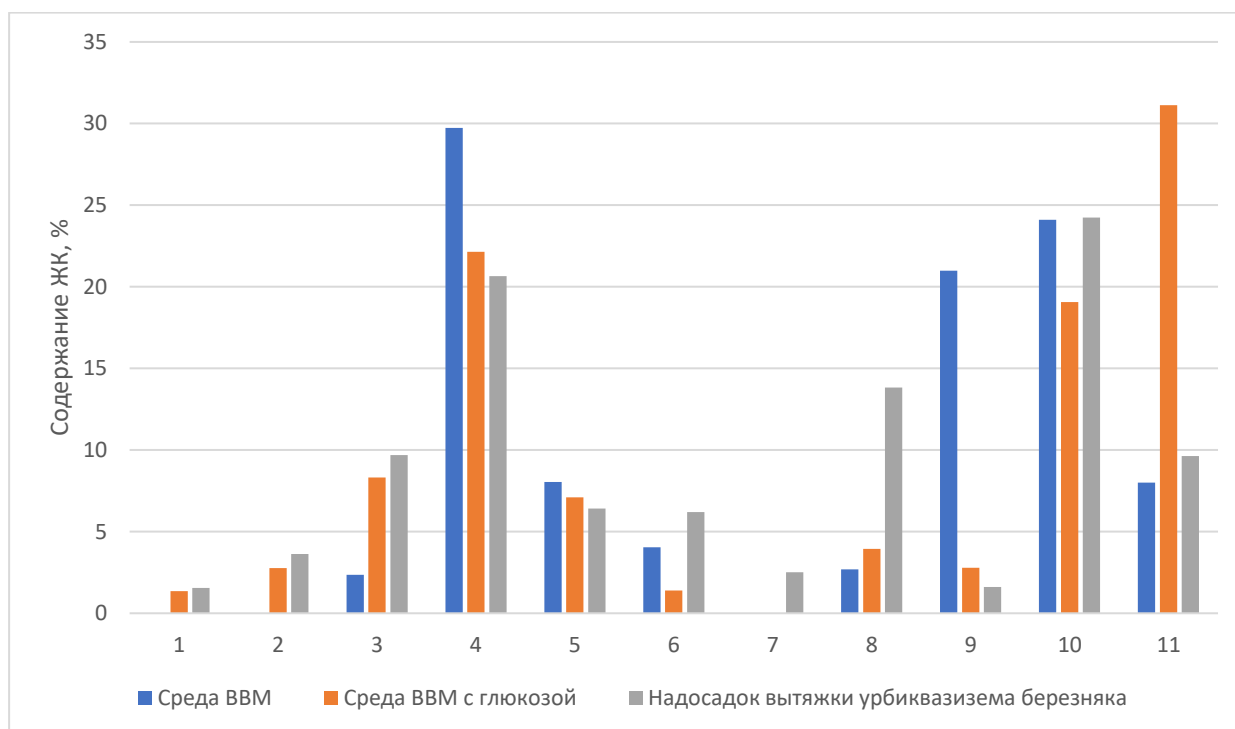


Рисунок 2. Распределение процентного содержания жирных кислот.

(1 – миристиновая кислота, 2 – пентадекановая кислота 3– пентадеценная кислота, 4 – пальмитиновая кислота; 5 – пальмитолеиновая кислота; 6 – маргариновая, 7 – цис-10-гептодекановая кислота, 8 – стеариновая кислота, 9 – олеиновая кислота; 10 – линолевая кислота; 11 – линоленовая кислота)

Литература

1. Yaacob N. S. et al. The Effectiveness of Soil Extracts from Selangor Peat Swamp and Pristine Forest Soils on the Growth of Green Microalgae sp // Forests. 2022. № 1 (13).

Получение *in situ* гидрогелевых скаффолдов на основе модифицированной гиалуроновой кислоты в процессе радикальной реакции, активируемой красным светом ($\lambda=660$ нм)

В.И. Кузьева¹, А.В. Сочилина^{1,2}, А.Г. Савельев¹, И.С. Сергеев^{1,3}, Г. Бабаева⁴, А.Н. Генералова^{1,2}, Е.В. Хайдуков^{1,2}.

¹ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

²Институт биоорганической химии им академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

³Инновационный центр “Сколково”

⁴ФГБУ “МНИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина” Минздрава России

Тканевая инженерия представляет собой комплекс подходов к созданию специальных конструкций (скаффолдов), стимулирующих восстановление повреждённых тканей и органов, и в настоящее время активно развивается. Актуальной задачей тканевой инженерии является создание биосовместимых гидрогелевых скаффолдов, которые должны в наибольшей степени имитировать свойства замещаемых тканей. Одно из решений этой задачи связано с разработкой новых композиций и методов получения гидрогелевых конструкций с помощью реакции фотоиндуцируемой сшивки, активируемой излучением, попадающим в окно прозрачности тканей. Такой метод позволит формировать скаффолды непосредственно в организме малоинвазивными способами. Многообещающим материалом для получения структурно-организованных скаффолдов является эндогенный полисахарид гиалуроновая кислота (ГК).

В данной работе для получения полимера, способного к фотоиндуцируемой сшивке, был использован способ химической модификации ГК глицидилметакрилатом для введения двойных связей, способных вступать в радикальную реакцию под действием света [1]. Для активации процесса фотосшивки модифицированной ГК (мГК) в качестве фотоинициатора использовали водорастворимое производное фталоцианина, имеющее полосу поглощения в красном диапазоне спектра, проходящего через живую ткань (рис. 1). В качестве соинициатора для ускорения реакции был использован меркаптоэтанол. Исследование физико-химических свойств скаффолдов, а также использование фантомов, имитирующих рассеяние света тканями организма, позволило управлять механическими свойствами, степенью адгезии и структурой сшитых гидрогелей для адаптации к свойствам мягких тканей организма.

Визуализация скаффолдов внутри животных (мышей) осуществлялась на установке IVIS при возбуждении на длине волны 675 нм и регистрации люминесцентного сигнала на длине волны 720 нм. Сигнал сохранялся на протяжении всего эксперимента (14 дней), при этом отмечено, что накопление производного фталоцианина происходит в печени животных.

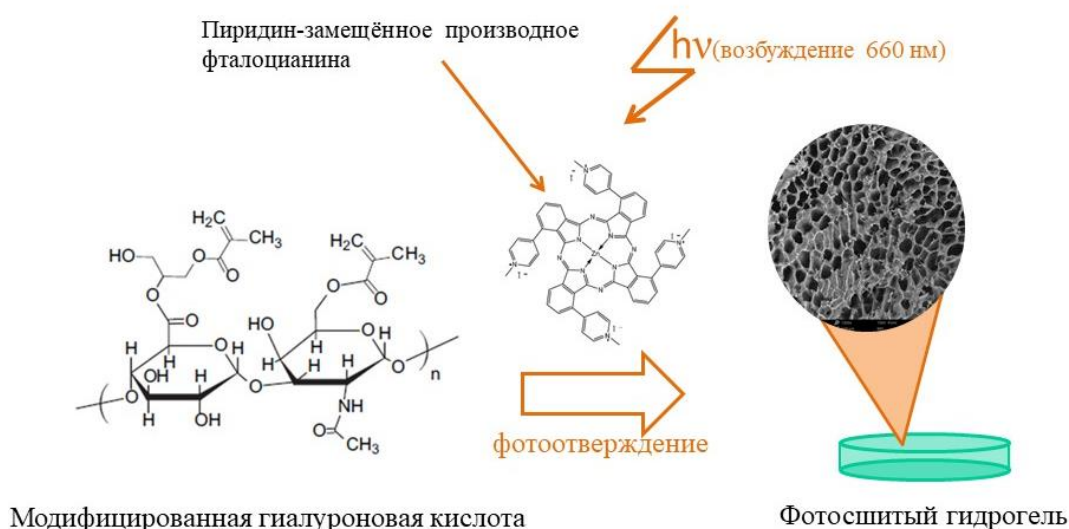


Рисунок 1. Схема фотоиндуцируемой сшивки гиалуроновой кислоты с привитыми двойными связями светом из красного диапазона видимого излучения. Приведена формула водорастворимого фталоцианина в качестве фотоинициатора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-79-10384. Авторы работы выражают благодарность Александру Ефимову и Lijo George из Tampere University за синтез водорастворимого фталоцианина.

Литература

1. *Sochilina A.V. et al.* Preparing Modified Hyaluronic Acid with Tunable Content of Vinyl Groups for Use in Fabrication of Scaffolds by Photoinduced Crosslinking //Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2021. – Т. 47. – С. 828-836.

2. *George L. et al.* Photodynamic self-disinfecting surface using pyridinium phthalocyanine //Dyes and Pigments. – 2017. – Т. 147. – С. 334-342.

УДК 620.3

Получение гибридных органо-неорганических наноструктур на основе наночастиц с антистоксовой флуоресценцией для биомедицинских исследований

А.О. Душина¹, П.А. Демина^{2,3}, Е.В. Хайдуков^{2,3}, А.Н. Генералова^{1,2}

¹Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

²Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской академии наук

³Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук

В связи с чрезмерным использованием антибиотиков в медицине и производстве продуктов питания, а также их целенаправленным механизмом действия отмечена возрастающая скорость распространения генов устойчивости к антибиотикам. Это приводит к неэффективным результатам терапии и более высокой смертности во всем мире. Данный факт означает, что для борьбы с инфекциями необходимы новые лекарства и методы лечения. В связи с этим поиск альтернативных подходов, позволяющих преодолеть резистентность к классическим противомикробным препаратам, приобретает первостепенное значение [1].

В последнее время нанотехнология зарекомендовала себя в качестве быстрорастущей области исследований, затрагивающей многие сферы деятельности, в том числе и биомедицину. Большой интерес вызывают фотолюминесцентные наночастицы с антистоксовой флуоресценцией (НАФ). Данные наночастицы представляют собой нанокристаллы NaYF_4 , легированные ионами редкоземельных элементов Yb^{3+} , Er^{3+} или Tm^{3+} , способные преобразовывать свет ближней ИК области в УФ и видимое излучение благодаря способности к ап-конверсии (рис. 1а, б). Важной особенностью таких нанокристаллов является возможность использования возбуждающего излучения, попадающего в «окно прозрачности» биоткани, что позволяет увеличить глубину проникновения в биоткани до нескольких сантиметров, не вызывая при этом фотоповреждения клеток.

Ранее НАФ зарекомендовали себя в качестве перспективного материала для создания наноплатформ с противоопухолевыми свойствами [2, 3], однако НАФ, покрытые термочувствительными полимерами, с соединениями, иммобилизованными на поверхности и проявляющими противомикробную активность, также могут стать эффективным средством в борьбе с антибиотикорезистентностью. В качестве такого соединения можно использовать краситель бенгальский красный, который имеет широкий спектр применений: от флуоресцентного окрашивания до ингибирования роста колоний бактерий и борьбы с злокачественными образованиями [4]. Еще одним соединением, обладающим противомикробной активностью [5], является метиленовый синий, который широко используется как антисептическое средство в медицине.

Особенность НАФ заключается в их получении в органических растворителях, поэтому необходимо разработать способы модификации, позволяющие получать биосовместимые, гидрофилизированные формы НАФ. Кроме того, необходимо проводить биофункционализацию НАФ, которая определит их применение в биомедицинских исследованиях.

Дизайн процесса получения мультифункциональных структур на основе наночастиц с антистоксовой флуоресценции, обладающих термочувствительными и противомикробными свойствами, был основан на нескольких стадиях (рис. 1в): 1. гидрофилизация поверхности; 2. биофункционализация; 3. включение красителя.

В данной работе модификация поверхности проводилась методом послойного осаждения (англ. Layer-by-Layer). Гидрофилизацию поверхности НАФ проводили путем адсорбции полимеров (полиэтиленимин (ПЭИ)) на поверхности НАФ без удаления стабилизатора (олеиновой кислоты) и переводом в водную среду с последующим испарением растворителя. Была получена водная дисперсия НАФ, модифицированных ПЭИ. Далее для наноструктур, предполагающих включение метиленового синего, проводилось создание еще одного покрытия из сополимера малеиновой и полиакриловой кислот, которое способствует лучшей адсорбции красителя на поверхность за счет противоположных зарядов.

Для биофункционализации НАФ был использован термочувствительный полимер поли (N – винилкапролактама) (ПВК) с нижней критической температурой растворения (НКТР) в диапазоне физиологических температур (НКТР~32°C), что дает возможность использования в биологических объектах. Далее проводилось включение красителей (бенгальский красный, метиленовый синий) с противомикробной активностью в модифицированную поверхность наночастиц.

Для исследования высвобождения красителя за счет термочувствительных свойств ПВК проводилось нагревание водной дисперсии гибридных наноструктур при температуре 40°C в течение 40 минут. Были получены спектры поглощения красителей в надосадочной жидкости до и после нагревания дисперсии НАФ. Для НАФ с иммобилизованным на поверхности бенгальским красным и метиленовым синим концентрация каждого красителя в надосадочной жидкости увеличивалась вдвое при нагревании, что говорит о высвобождении соединений с поверхности наночастиц.

Были получены гибридные органо-неорганические наноструктуры на основе наночастиц с антистоксовой флуоресценции с термочувствительными, флуоресцентными и противомикробными свойствами, что говорит о возможности создания наноплатформ на основе ап-конвертирующих нанофосфоров с биофункционализированным покрытием для борьбы с патогенами. Данные наноструктуры могут лечь в основу получения препаратов, способных локально бороться с инфекциями без возникновения общей резистентности к определенному виду соединений.

Авторы выражают благодарность программе «Приоритет-2030», проводимой под руководством молодых перспективных исследователей (лаборатория «Лазерные технологии для биомедицинских технологий» МПГУ).

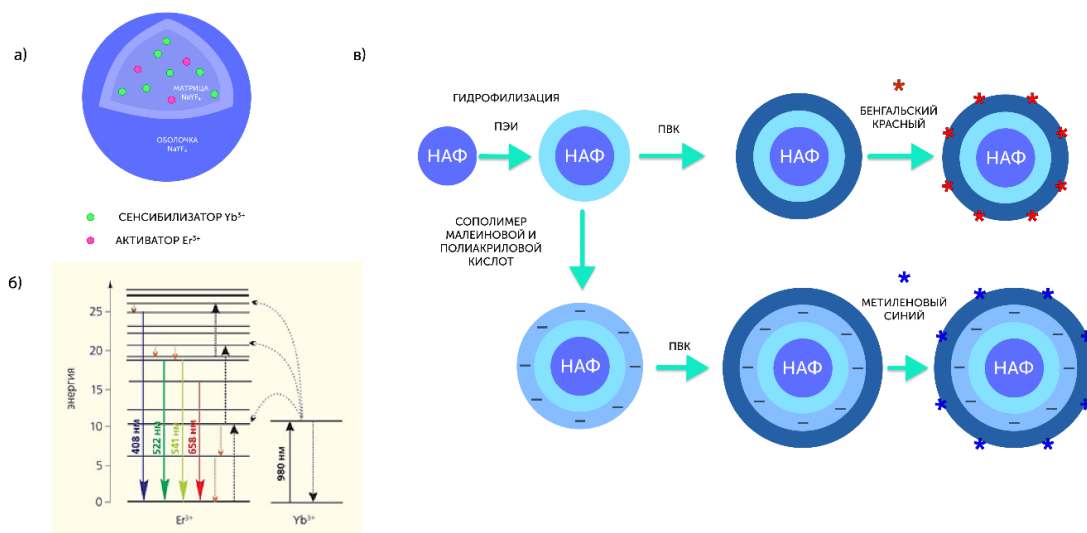


Рисунок 1. Наночастицы с антистоксовой флуоресценцией (НАФ): а) строение НАФ; б) диаграмма энергетических уровней, объясняющая механизм ап-конверсии в кристаллах $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Er}^{3+}$ при возбуждении источником с длиной волны 980 нм; в) схема дизайна НАФ, содержащих термочувствительный полимер и краситель с противомикробными свойствами

Литература

1. Frieri M., Kumar K., Boutin A. Antibiotic resistance // J Infect Public Health. 2017. V. 10(4). P. 369-378.
2. Generalova A.N., Chichkov B.N., Khaydukov E.V. Multicomponent nanocrystals with anti-Stokes luminescence as contrast agents for modern imaging techniques // Adv. Colloid Interface Sci. 2017. V. 245, P. 1–19.
3. Cheng L., Wang C., Liu Z. Upconversion nanoparticles and their composite nanostructures for biomedical imaging and cancer therapy // Nanoscale. 2013. V.5. P. 23–37.
4. Demartis S., Obinu A., Gavini E. [et al.] Nanotechnology-based rose Bengal: A broad-spectrum

biomedical tool // Dyes and Pigment. 2021. V. 188. № 109236.

5. Souza R.C., Junqueira J.C., Rossoni R.D. [et al.] Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans* // Lasers in Medical Science. 2010. V. 25, P. 385–389.

УДК 577.352.2

Скрытый изгибный стресс приводит к спонтанной тубуляции мембран под действием амфипатических пептидов

В.К. Крамкова^{1,2}, Д.В. Ивченко², П.В. Башкиров^{2,3}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²ФГБУ Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства

³ФБУН НИИ СБМ Роспотребнадзора

Клеточные мембраны формируют сложные динамические структуры, которые для поддержания процессов жизнедеятельности должны определенным образом менять свою геометрию. Изменение формы и топологии мембранных структур в клетке происходит в результате скоординированной во времени и пространстве работы специальных белков. Существует несколько принципиально различных молекулярных механизмов, лежащих в основе морфогенеза клеточной мембраны, и во всех из них липидному бислою отводится пассивная роль объекта, деформируемого белками за счет: полимеризации, моторной деятельности, ферментативной активности, макромолекулярной скученности (т.н. «краудинг»), а также вставки амфифильной спирали на границу раздела полярной/гидрофобной области липидного бислоя. Последний механизм предполагает, что тубуляция происходит под действием спонтанного натяжения, возникающего в бислоиных мембранах в результате вызванной адсорбцией спонтанной кривизны [1]. Спонтанное натяжение равно плотности свободной энергии мембраны с нулевой кривизной и пропорционально модулю изгиба мембраны. Однако, одновременно с этим экспериментально [2] и теоретически [3] показано, что в открытых системах компоненты, индуцирующие большую спонтанную кривизну, приводят к значительному уменьшению эффективной изгибной жесткости за счет термодинамического сопряжения кривизны и состава мембраны. Это должно приводить к существенному уменьшению спонтанного натяжения и, следовательно, затруднять спонтанную тубуляцию мембран.

В данной работе на примере Н0 пептида ENTH домена, а также искусственно созданных пептидов с похожим гидрофобным профилем, нами проведено исследование их способности вызывать спонтанную тубуляцию свободных – механически не натянутых липидных бислоев различного состава. Показано, что все исследуемые пептиды вызывали формирование мембранных нанотрубок на поверхности липидных бислоев, но только, если в составе мембран присутствовал, так называемый, не-бислоиный липид - фосфатидилэтаноламин (ФЭ). Данное наблюдение было связано со скрытым изгибным стрессом, который вызывает встраивание ФЭ в плоский монослой. В силу симметрии липидного бислоя, суммарный изгибный момент в нем изначально равен нулю. Адсорбция пептида на один из монослоев уменьшает его изгибную жесткость и тем самым нарушает механическое равновесие. Измерения радиуса формирующихся нанотрубочек показали, что его значение практически совпадало с величиной спонтанной кривизны липидной смеси. Из чего было сделано заключение, что эффективная изгибная жесткость внешнего монослоя уменьшается на порядок. Это также подтверждается отсутствием тубуляции при добавлении пептида к мембранам, сформированным из цилиндрических липидов, имеющих нулевую спонтанную кривизну. На основании полученных данных мы делаем вывод о существовании универсального механизма регуляции геометрической кривизны мембран, в основе которого лежит липид-белковый синергизм – амфифильные спирали размягчают внешний монослой мембраны, в то время как некомпенсированный изгибный момент, индуцируемый не-бислоиными липидами во внутреннем монослое, заставляет мембрану принять кривизну, при которой момент исчезает.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-15-00265

Литература

1. Lipowsky R. Spontaneous tubulation of membranes and vesicles reveals membrane tension generated by spontaneous curvature. // Faraday discussions V. 161, P. 305-331.

2. *Bashkirov P.V. et al.* Reconstitution and real-time quantification of membrane remodeling by single proteins and protein complexes // *Nature Protocols* 2020. V. 15. P. 2443-2469.

3. *Bashkirov P.V. et al.* Molecular Shape Solution for Mesoscopic Remodeling of Cellular Membranes// *Annual Review of Biophysics* 2022 V. 51:1, P. 473-497.

УДК 620.3

Получение фототоксического комплекса на основе наночастиц серебра и рибофлавина, генерирующего активные формы кислорода

И.И. Евстратова^{1,3,4}, П.А. Демина^{1,2,4}, Е.Д. Белицкая¹, А.В. Залыгин^{1,3}, В.А. Олейников^{1,3}, Е.В. Хайдуков^{1,2,4}, А.Н. Генералова^{1,2}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ² Институт фотонных технологий «Кристаллография и фотоника» РАН

³ Национальный исследовательский ядерный университет «Московский инженерно-физический институт»

⁴ Московский педагогический государственный университет

Перспективной альтернативой антибиотикам является антимикробная фотодинамическая терапия, основанная на генерации активных форм кислорода (АФК) при облучении фотосенсибилизатора. АФК разрушают биомолекулы и приводят к гибели микроорганизмов. В литературе продемонстрировано успешное применение флавинонуклеотида (производное витамина В₂), который в триплетном состоянии (после облучения) является сильным окислителем, а также может выступать в качестве фотосенсибилизатора, способного к наработке синглетного кислорода. Известно, что эффективность действия АФК значительно увеличивается в случае использования в виде гибридных органо-неорганических наночастиц на основе металлов и оксидов металлов [1]. Таким образом, создание наночастиц, сочетающих антибактериальную активность наночастиц серебра и фототоксичность флавинонуклеотида, а также исследование механизма их действия является актуальной задачей.

В данной работе на основе наночастиц серебра (d~20 нм), полученных при участии цитрата натрия в качестве восстановителя, созданы комплексы с флавинонуклеотидом (ФМН) и исследована их способность к генерации АФК. Оптическое поглощение исходных компонентов и их комплексов не изменялось в течение 1 ч. При облучении светом на длине волны 365 нм уже через 30с наблюдалось образование люмихрома, который является продуктом фотодеградации ФМН (рис. 1а), а поглощение наночастиц серебра незначительно увеличивалось с небольшим сдвигом пика в синюю область, что, вероятно, связано с появлением более мелкой фракции наночастиц. В случае комплекса ФМН-наночастицы серебра при облучении пики фотопродуктов ФМН не были зарегистрированы, а наблюдалось возрастание поглощения при сглаживании пиков (рис. 1в), при этом флуоресценция ФМН в комплексе была почти в 2 раза выше и ее тушение при облучении составляло 29%, в отличие от ФМН, у которого было порядка 46% потери флуоресценции (рис. 1 б, г). Это может быть связано с образованием комплекса на основе переноса электронов, поскольку ФМН является эффективным акцептором, а наночастицы могут выступать в качестве донора электронов.

В процессе облучения происходит генерация таких АФК, как супероксид анион (O₂^{•-}), гидроксильный радикал (•ОН) и синглетный кислород (¹O₂). Образование радикалов регистрировали по снижению поглощения стабильного радикала дифенилпикрилгидразила на длине волны 525 нм, ответственного за реакцию с образующимися радикалами. В случае отдельных компонентов комплекса практически не наблюдалось изменение величины пика на длине волны 525 нм, но отмечено увеличение плеча на спектре наночастиц серебра на длине волны 420 нм. В случае гибридных комплексов регистрировали экстремальную зависимость с максимальной наработкой радикалов при облучении 150 с. Известно, что эффективность генерации радикалов ФМН повышается при использовании аминов, например, триэаноламина [2], что было подтверждено снижением до 30 с времени, необходимого для появления радикалов (рис.1д). Таким образом, данное исследование представляет разработку подходов для контролируемого повышения эффективности антимикробной фотодинамической терапии с использованием комплексов ФМН-наночастицы серебра.

Авторы выражают благодарность программе «Приоритет-2030», проводимой под руководством молодых перспективных исследователей лаборатория «Лазерные технологии для биомедицинских технологий» МПГУ.

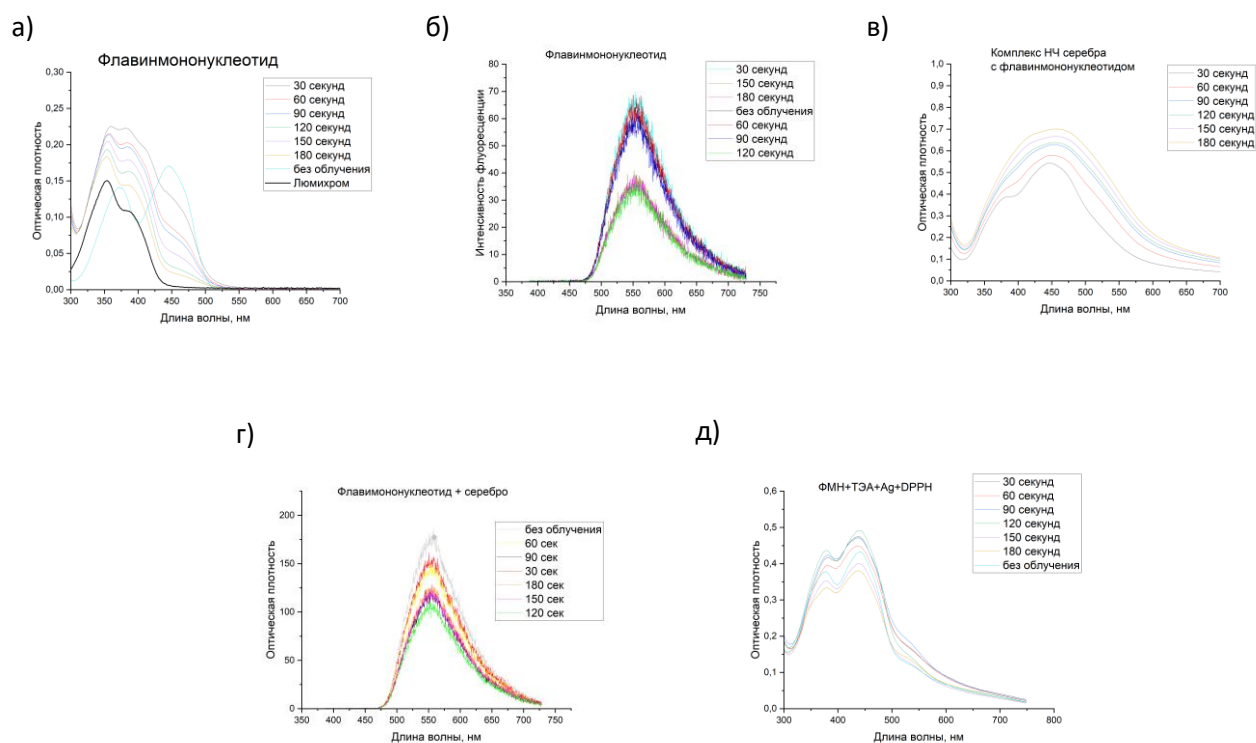


Рисунок 1. (а), (в), (д) спектр поглощения флавинмононуклеотида, комплекса флавинмононуклеотида с наночастицами серебра и комплекса флавинмононуклеотида с наночастицами серебра с добавлением триэтаноламина и дифенилпикрилгидразида соответственно; (б), (г) спектр флуоресценции флавинмононуклеотида и комплекса флавинмононуклеотида с наночастицами серебра, соответственно.

Литература

1. Aiello M.B.R., Ghilini F., Porcel J.E.M., Giovanetti L., Schilardi P.L., Mártire D.O., Riboflavin-Mediated Photooxidation of Gold Nanoparticles and Its Effect on the Inactivation of Bacteria // LANGMUIR 2020 P. 8272-8281
2. Ahmad I., Iqbal K., Sheraz M.A., Ahmed S., Mirza T., Kazi S.H. and Aminuddin M., Photoinitiated Polymerization of 2-Hydroxyethyl Methacrylate by Riboflavin/Triethanolamine in Aqueous Solution: A Kinetic Study // International Scholarly Research Notices 2013
3. He W., Zhou Y.T., Wamer W.G, Boudreau M.D., Yin J.J., Mechanisms of the pH dependent generation of hydroxyl radicals and oxygen induced by Ag nanoparticles // Biomaterials 2012 P. 7547-7555
4. Mokashi V.V., Walekar L.S., Anbhule P.V., Lee S.H., Patil S.R., Kolekar G.B., Study of energy transfer between riboflavin (vitamin B2) and AgNPs // RESEARCH PAPER 2014 P/1-11

Экспериментальное исследование возможности ультразвукового разрушения тромбов*П.И. Горбунова, А.С. Борде*

Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана
(национальный исследовательский университет)

Произведен эксперимент для разработки метода удаления тромбов нижних конечностей с применением низкочастотного ультразвука. Основной задачей являлось получение частиц размером менее 10 мкм, что необходимо для безопасной эвакуации фрагментированных частиц. Эксперимент реализован с использованием аппарата ультразвукового хирургического «ФОТЕК» (ООО «ФОТЕК», г. Екатеринбург), а также датчика пыли Sharp GP2Y1010AU0F и микроконтроллера Arduino Mega 2560 для фиксации размера частиц, полученных в результате разрушения. Воздействие производилось с частотой 24 кГц и амплитудой 50 мкм в течение двух минут. Для выбора физической модели тромба были произведены исследования с различными материалами, результаты которых сведены в таблицу 1.

В результате разрушения фантомов из силикона экофлекс, выбранного в качестве материала, наиболее точно соответствующего механическим и функциональным свойствам тромба для данного вида исследования, получены графики, приведенные на рисунке 1. Зависимость концентрации от времени воздействия аппроксимирована экспоненциально. Возрастание кривых, полученных в результате 6 экспериментов, позволяет сделать вывод о увеличении числа частиц с диаметром менее 2,5 мкм с увеличением времени воздействия, в связи с чем можно утверждать о возможности реализации внутрисосудистого ультразвукового метода для проведения тромбэктомии, благодаря которому можно избежать закупорки сосудов частицами, полученными в результате разрушения тромботических масс.

Таблица 1. Результаты эксперимента по выбору фантома тромба

Материал	Физические свойства	Функциональные свойства
Желатин	Модуль Юнга 100 кПа Средняя плотность 1000 кг/м ³	Поддается фрагментации, но при этом выделяется большое количество жидкости, превращая экспериментальный материал в суспензию, не поддающуюся исследованию датчиком пыли. Достаточно прост в изготовлении.
Силикон Tooldecor 40	Модуль Юнга 300 кПа. Плотность 1100 кг/м ³	Очень плохо поддается фрагментации, длительный процесс изготовления.
Силикон Ecoflex	Модуль Юнга 100 кПа Плотность 1040 кг/м ³	Хорошо поддается фрагментации, длительной процесс изготовления.
Агар-агар	Модуль Юнга 100 кПа Плотность 1000 кг/м ³	Поддается фрагментации, но при этом выделяется большое количество жидкости, превращая экспериментальный материал в суспензию, не поддающуюся исследованию датчиком пыли. Достаточно прост при изготовлении.

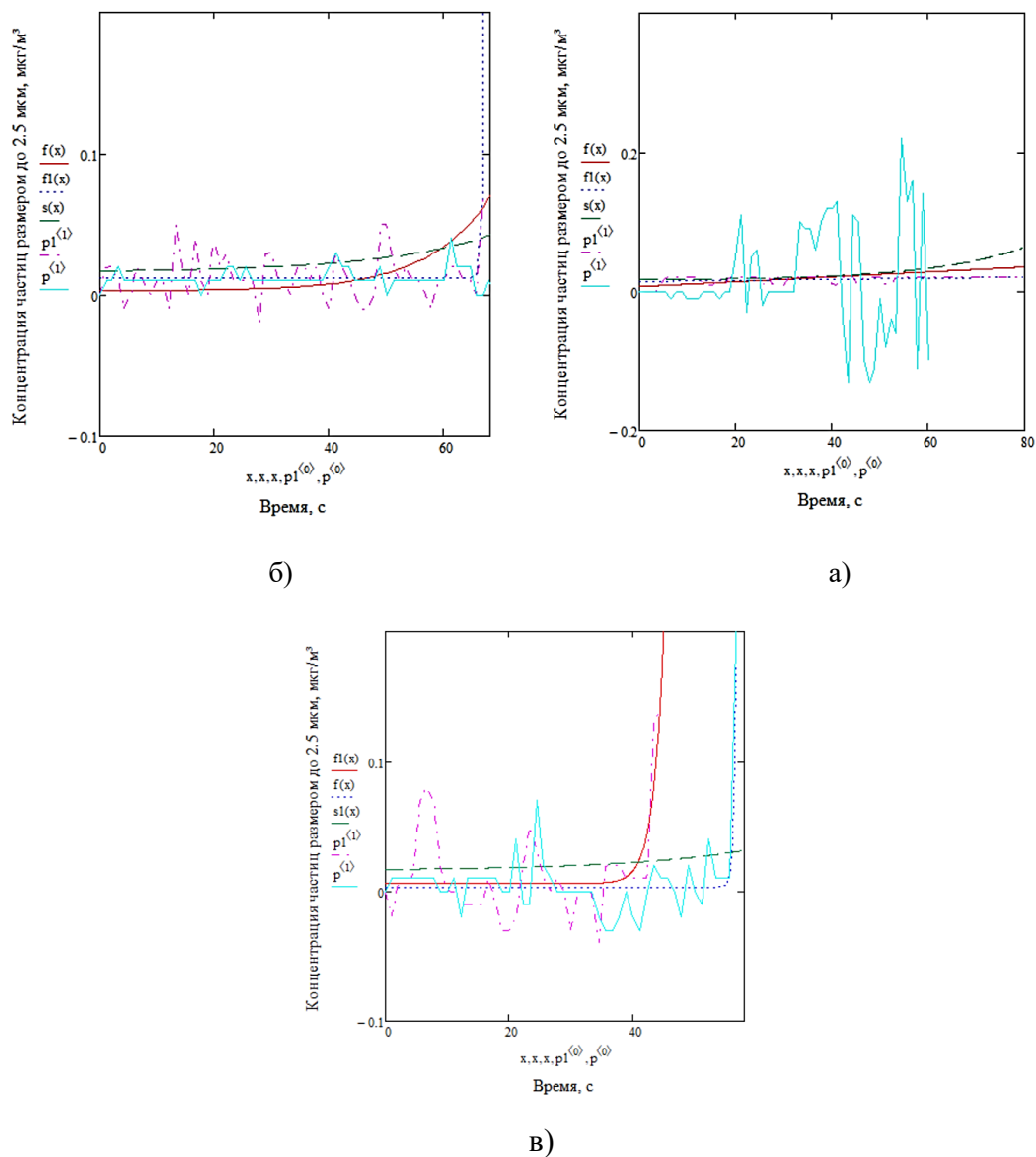


Рисунок 1. График зависимости концентрации частиц от времени воздействия ультразвуковым инструментом для первой (а), второй (б) и третьей (в) пары экспериментов (розовая и голубая кривые – исходные данные для пары экспериментов, голубая и синяя кривые – экспоненциальная аппроксимация полученных данных, зеленая кривая – усредненная аппроксимация)

Литература

1. Wortmann N. et al. Development of synthetic thrombus models to simulate stroke treatment in a physical neurointerventional training model // All life, v. 15, №. 1, 2022 – p.20
2. Flynn H.G. Physics of acoustic cavitation in liquids // Physical acoustics. N.Y.: Academic Press, 1964. V. I. p.172

УДК 57.086.2

Разработка аппаратного метода одновременного избирательного освещения различных участков микропрепаратов с использованием микрозеркальной матрицы

И.А. Сидоров¹, К.С. Степной², О.В. Дорож², Е.В. Табунов²

¹Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно – технологический университет Сириус»

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Избирательное освещение различных участков микропрепаратов крайне важно при изучении взаимодействия со светом биологических образцов, например, для фототермической и фотодинамической терапии, фотостимуляции [1] и других процессов. В настоящее время для подобных задач в микроскопии используются гальванометрические сканирующие системы (гальваносканер), в которых лазер служит источником возбуждающего света, а позиционирование луча осуществляется переотражением от двух зеркал, где первое отвечает за перемещение луча по оси X и второе по оси Y, соответственно. Хотя подобные системы получили широкое распространение благодаря высокому разрешению, в силу конструкционных особенностей гальваносканеров такие устройства демонстрируют крайне низкую скорость сканирования микропрепарата [2]. Это накладывает ограничения на возможность исследовать ряд быстропротекающих биологических процессов, например, передачу сигналов в нейронах, где скорость сигнала на порядок выше, чем скорость перемещения лазера. В качестве альтернативы таким устройствам могут быть рассмотрены микрзеркальные матрицы (DMD) [3], которые способны моментально формировать паттерн возбуждения одновременно нескольких участков поверхности микропрепарата, поэтому в большей степени подходят для наблюдения таких процессов.

В данной работе предложен метод, позволяющий одновременно освещать выбранные пользователем области микропрепарата. Для реализации предлагаемого метода был разработан экспериментальный стенд с использованием инструментального микроскопа ИМЦ-100-50А (АО "Новосибирский приборостроительный завод", Россия) и DMD матрицы разрешением 1024×768 пикселей и диагональю 0.55 дюйма. Для удобства проектирования матрица использовалась в составе мультимедийного проектора, оптика которого была модифицирована для совместимости с микроскопом. В предложенном методе излучение проектора проходит через светоделительный кубик, расположенный в месте крепления камеры тринокуляра микроскопа, и проецируется на микропрепарат через объектив. Вместо одного из окуляров была установлена цифровая камера, позволяющая одновременно визуализировать образец и формируемое на нем изображение. Объектив был выбран исходя из необходимости наблюдения типичных биологических объектов с линейными размерами от 1 мкм. Разрешающая способность созданного прототипа была экспериментально определена с помощью позитивного фоторезиста POSITIV 20 (KОНТАКТ СЕМІЕ, Бельгия) и составила 4 мкм. Для выбранного проектора максимальный световой поток составил 2800 лм, при этом мощность светового потока можно было регулировать в пределах от 3.5 мВт/см² до 8 Вт/см², что полностью перекрывает потребности для предполагаемых биологических применений.

Прототип установки управлялся программным обеспечением MicroManager [4]. Открытый исходный код и широкая распространенность данного ПО позволят легко внедрить разработанный метод в практику.

Таким образом, в ходе работы был создан аппаратный метод, позволяющий одновременно освещать различные области микропрепаратов. Такие свойства разработанного метода, как 1) разрешение, 2) точный контроль мощности излучения при простой конструкции, 3) совместимость метода с популярным и открытым программным обеспечением, делают его перспективным для практического применения в инженерно-конструкторских работах и биомедицинских исследованиях.

Литература

1. Kim C., Adhikari A., Deisseroth K. Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 18, 222–235 (2017). doi.org/10.1038/nrn.2017.15
2. Confocal Microscope C2+ Brochure. URL: https://downloads.microscope.healthcare.nikon.com/phase4/literature/Brochures/c2_2ce-schj-1.pdf.
3. Edward Carlo Samson and Carlo Mar Blanca Dynamic contrast enhancement in widefield microscopy using projector-generated illumination patterns. *New J. Phys* 2007, 9, 363.
4. Open Source Software for Control and Automation of Microscope Hardware. URL: <https://micro-manager.org/>.

УДК 57.037

Сравнительный анализ ФДЭ ингибирующей и NO-донорной активности нитрозильных комплексов железа с тиомочевинными и тиосульфатными лигандами

А.Ю. Кормухина^{1,2}, Л.В. Татьяненко², О.В. Покидова², Н.А. Санина^{1,2,3}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

²Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии
РАН

³Научно-образовательный центр «Медицинская химия» Московского
государственного областного университета

Известно, что для обеспечения нормальной работы человеческого организма необходима работа несколько тысяч различных ферментов, которые выступают в роли катализаторов биохимических реакций, и большинство из них подробно изучены и описаны.

Установлено, что процесс вазодилатации происходит при комплексном действии нескольких ферментативных систем: гуанилатциклазы (ГЦ) и фосфодиэстеразы (ФДЭ). Монооксид азота (NO), будучи необходимым компонентом функционирования сердечно-сосудистой системы, реагирует с гемом фермента ГЦ, который катализирует выработку циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). Последний запускает каскад биологических реакций, приводящий к расслаблению гладкой мускулатуры кровеносных сосудов. В свою очередь, ФДЭ расщепляет фосфоэфирную связь в циклических нуклеотидах (цГМФ), переводя их в неактивную нециклическую форму [1]. Таким образом, применение в лечебной практике комбинированных препаратов, обладающих свойствами активации ГЦ и, при этом, ингибирования ФДЭ, способствовало бы более выраженному терапевтическому эффекту.

Как известно, нитрозильные комплексы железа (НКЖ) являются природными депо оксида азота (NO) в организме. Их синтетические аналоги, низкомолекулярные НКЖ, обладают рядом преимуществ по сравнению с другими донорами NO, которые используются в настоящее время [2].

В ФИЦ ПХФ и МХ РАН проводятся работы по синтезу, исследованию физико-химических свойств и биологической активности данного перспективного класса экзогенных доноров NO.

Целью настоящей работы является изучение NO-донорной активности биологически активных представителей этого семейства - биядерного анионного НКЖ с тиосульфатными лигандами $[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (комплекс **1**) [3,4] и моноядерного катионного НКЖ $[\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)_2)_2(\text{NO})_2]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (комплекс **2**) [5] (рис. 1) и их влияния на ферментативные функции ФДЭ.

Концентрацию фосфатов определяли спектрофотометрическим методом в двойной ферментативной системе как представлено на рис. 2. Было установлено, что при концентрациях 0.1 mM, 0.01 mM и 0.001 mM комплекс **1** ингибирует действие ФДЭ на $100 \pm 10\%$, $87 \pm 9\%$, $65 \pm 7\%$, соответственно, а комплекс **2** - на $87 \pm 9\%$, $23 \pm 2\%$, $40 \pm 4\%$ при аналогичных условиях, соответственно. Тиолатные лиганды в исследуемом диапазоне концентраций не оказывают значительного влияния на функции фермента. Для комплекса **1** была рассчитана константа ингибирования из графика зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата: $K = 1 \mu\text{M}$.

Для оценки NO-донорной активности комплексов удобно использовать колориметрический метод Грисса, с помощью которого определяли концентрацию нитрит-ионов – основных продуктов превращения NO в водных аэробных растворах. Согласно полученным данным, оба комплекса являются эффективными донорами NO, кривые накопления нитрит-ионов выходят на плато за 10 мин.

Таким образом, полученные результаты позволяют рекомендовать данные комплексы для дальнейшего изучения в качестве потенциальных лекарственных препаратов антигипертензивного и вазодилаторного действия.

Работа выполнена по теме государственного задания, № государственной регистрации АААА-А19-119071890015-6.

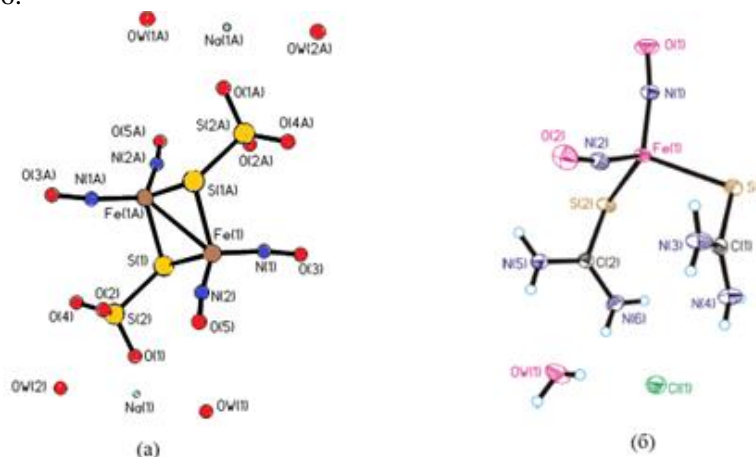


Рисунок 1. Молекулярные структуры комплекса 1(а) и комплекса 2(б).

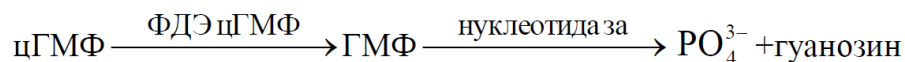


Рисунок 2. Накопление неорганического фосфата в результате ферментативной реакции гидролиза цГМФ.

Литература

1. McDonald L.J. et.al. Nitric Oxide and cGMP Signaling // *Advances in Pharmacology*, V. 34. 1995. P. 263–275.
2. Pecto D.C. et.al. Toward the optimization of dinitrosyl iron complexes as therapeutics for smooth muscle cells // *Molecular Pharmaceutics*, V. 16. 2019. P.3178–3187.
3. Sanina N.A. et.al. Synthesis, Structure and Solid-Phase Transformations of Fe Nitrosyl Complex $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ // *Russian Journal of Coordination Chemistry*, V. 31. 2005. P. 301–306.
4. Vasil'eva S.V. et.al. Formation of Dinitrosyl Iron Complex Is a Necessary Step in the Realization of the $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\mu_2\text{-S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Genetic Activity // *Doklady Biological Sciences*, V. 402. 2005. P. 230–232.
5. Sanina N.A. et.al. Mesomeric tautomerism of ligand is a novel pathway for synthesis of cationic dinitrosyl iron complexes: X-ray structure and properties of nitrosyl complex with thiourea // *Inorganic Chemistry Communications*, V. 49. 2014. P. 44–47.

УДК 57.037

ДНК-регистрирующий агент, основанный на «умных» материалах

Ф.А. Завалко¹, Д.О. Новичихин², А.М. Скирда^{2,3}

¹Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

² Институт общей физики имени А. М. Прохорова РАН, Москва

³ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

«Умные» материалы» (УМ) – соединения, способные изменять свои физические свойства под воздействием внешних физических или молекулярных сигналов. В работе [1] были предложены УМ («наномаяки»), чувствительные к определенным последовательностям нуклеиновых кислот (НК). Показано, что такие наноструктуры являются перспективными агентами для анализа коротких (10-24 оснований) молекул и могут быть использованы для высокочувствительного и быстрого детектирования НК-маркеров социально-значимых заболеваний. Например, такие УМ могли бы быть использованы для оперативного выявления онкологических маркеров (микроРНК [2]), а также для исследования механизмов передачи информации, например, за счет недавно открытого механизма некомплементарной коммутации НК-цепей [3].

В данной работе впервые показан вариант реализации технологии «наномаяка» на твердой сенсорной поверхности в проточном формате с помощью интерферометрического биосенсора, разработанного в лаборатории биофотоники ИОФ РАН [4]. Принцип работы данного УМ заключается в следующем [1]: поверхность сенсорного чипа модифицируется золотыми наночастицами, которые ковалентно связываются с ДНК-олигонуклеотидом, модифицированным биотином на 5'-конце (B-S). В отсутствие комплементарной ДНК-цепи биотин «спрятан» и недоступен для взаимодействия с меткой – конъюгатом золотых наночастиц со стрептавидином (Au@Str), которая прокачивается над сенсорным чипом на финальной стадии анализа. Комплементарная ДНК (Sp) при взаимодействии с УМ образует дуплекс, при этом жесткость ДНК-цепи значительно увеличивается, что приводит к увеличению доступности биотина (рис. 1).

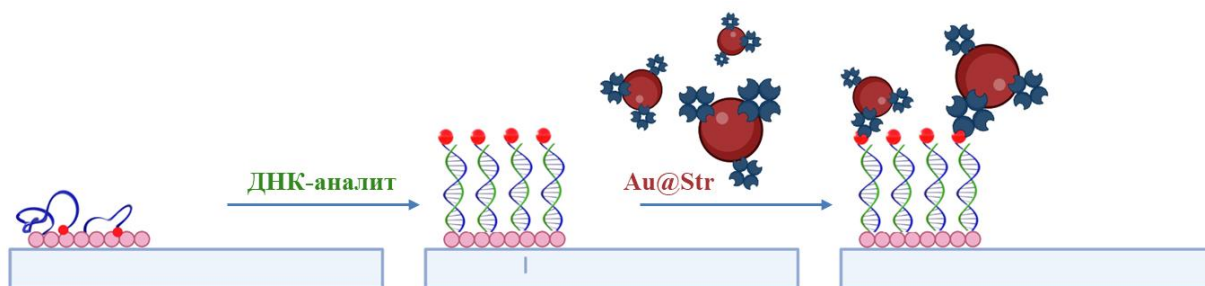


Рисунок 1. Принцип работы ДНК-«наномаяка» на поверхности биочипа.

Сигнал связывания метки (Au@Str) с поверхностью сенсорного чипа интерпретируется как увеличение толщины интерферирующего слоя и позволяет проводить количественную регистрацию комплементарной ДНК. На рис. 2 изображены: сенсограмма, отражающая стадии детектирования ДНК-аналита Sp (А), а также сигналы связывания метки Au@Str в случае присутствия ДНК-аналита (комплементарный, синие столбцы); и без него (контроль, красные столбцы) (Б). Показано увеличение доступности терминального биотина в присутствии ДНК-аналита, что приводит к увеличению сигнала связывания метки (Au@Str) с поверхностью (эффект «наномаяка»). Стоит отметить, что в случае блокировки поверхности 1% бычьим сывороточным альбумином (БСА) эффект «наномаяка» сохраняется, что указывает на возможность детектирования ДНК-аналита в присутствии БСА, и, возможно, других блокирующих агентов.

Ожидается, что предложенный биосенсор позволит не только увеличить чувствительность детектирования малых НК за счет более высокого соотношения сигнал/шум, но и измерить константы взаимодействия метки с поверхностью «наномаяка» по кинетическим параметрам кривых адсорбции/десорбции, что значительно сузит спектр поиска подходящих агентов и позволит в будущем улучшить аналитические характеристики систем детекции, основанных на УМ.

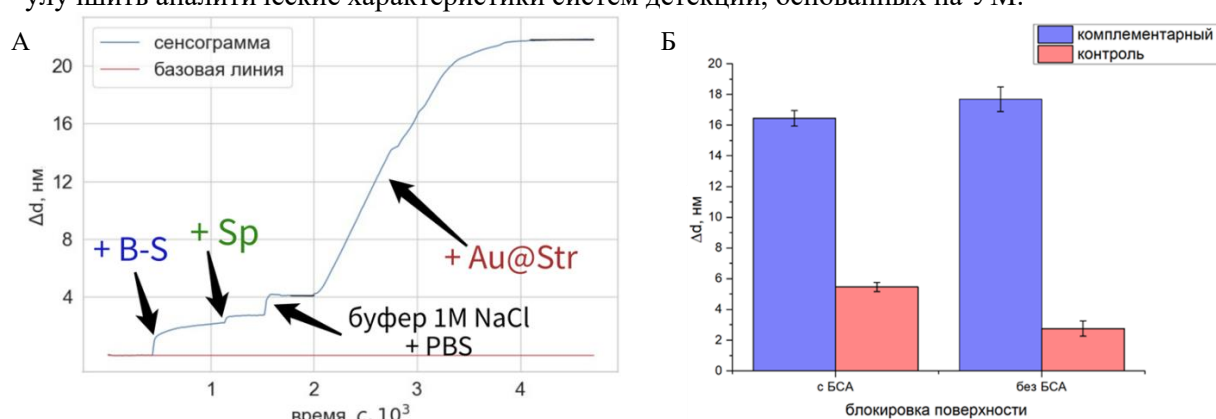


Рисунок 2. (А): сенсограмма, отражающая детектирование ДНК-аналита Sp; (Б): сигналы связывания метки Au@Str в случае присутствия ДНК-аналита (комплементарный): 16450±30 пм с блокировкой поверхности и 17690±50 пм без блокировки поверхности; и без него (контроль): 5460±30 пм с блокировкой поверхности и 2750±30 пм без блокировки.

Литература

1. Cherkasov V.K., Mochalova E., Babenyshev A.V., Vasilyeva A.D., Nikitin, P.I., Nikitin M.P. Nanoparticle Beacons: Supersensitive Smart Materials with On/Off-Switchable Affinity to Biomedical Targets. ACS Nano, 14(2), 1792–1803.
2. Kai K., Dittmar R.L., Sen S. Secretory microRNAs as biomarkers of cancer. Seminars in Cell & Developmental Biology, 78, 22-36.
3. Nikitin M.P. Non-complementary strand commutation as a fundamental alternative for information processing by DNA and gene regulation. Nature Chemistry, 15(1), 70–82.
4. Nikitin P.I., Gorshkov B.G., Valeiko M.V., Rogov S.I. Spectral-phase interference method for detecting biochemical reactions on a surface. Quantum Electronics, 30(12), 1099–1104.

Изменение термостабильности гликозил-гидролаз семейства 12 методами белковой инженерии

А.И. Селимзянова^{1,2}, С.В. Рыков¹, О.В. Березина¹

¹ НИЦ «Курчатовский институт», «Курчатовский комплекс генетических исследований»

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Активное развитие животноводства в России привело к увеличению потребности в кормах, в связи с чем одной из важнейших задач становится разработка импортозамещающих технологий получения отечественных кормовых ферментных препаратов. Для осахаривания и снижения вязкости кормов на основе растительной биомассы используют различные гликозил-гидролазы. Эти ферменты гидролизуют гемицеллюлозы клеточной стенки растений. Наиболее распространенными гемицеллюлозами являются линейный бета-глюкан и разветвленный ксилоглюкан, которые гидролизуются эндоглюканазами и ксилоглюканазами соответственно. Особый интерес представляют термостабильные ферменты, так как процесс подготовки кормов часто проходит при повышенной температуре. С помощью методов белковой инженерии возможно получение ферментов с улучшенными свойствами, в том числе с повышенной термостабильностью.

В работе [1] было определено, что введение валина в положение 35 целлюлазы Cel12A семейства GH12 из *Hypocrea jecorina* приводит к повышению термостабильности данного фермента.

Целью данной работы было конструирование и исследование мутантных вариантов гликозил-гидролаз семейства 12: высокотермостабильной эндоглюканазы Egh12 из термофильного гриба *Thielavia terrestris* и умеренно термостабильной ксилоглюканазы Xgh12 из *Aspergillus cervinus* [2, 3].

С помощью методов белковой инженерии, а именно, сайт-направленного мутагенеза, в аминокислотной последовательности Xgh12B была проведена замена тирозина на валин в положении 37, гомологичном положению 35 у Cel12A из *Hypocrea jecorina*, направленная на повышение термостабильности белка. Также получен мутант Egh12 V41S для подтверждения значимости валина для термостабильности данного фермента.

Дикие и мутантные варианты генов исследуемых белков встроены в вектор pET-28a по сайтам *BamHI/SalI*. Полученными плазмидами трансформированы штаммы *Escherichia coli* BL21-GOLD(DE3). *E. coli* использованы в качестве штамма-продуцента в связи с возможностью получения в них рекомбинантного белка в негликозилированном виде, подходящем для биохимических исследований и кристаллизации. Таким образом, были сконструированы рекомбинантные штаммы *E. coli* – продуценты диких и мутантных вариантов эндоглюканазы Egh12 и ксилоглюканазы Xgh12.

Далее проведен биосинтез белков Egh12, Egh12 V41S, Xgh12 и Xgh12 Y37V. Их ферментативная активность измерена с помощью метода с ДНС-реактивом. Показано, что фермент Xgh12 проявляет максимум активности при 55°C, pH 5.0, а мутантный вариант Xgh12 Y37V имеет более высокий максимум активности – 60°C, pH 5.0. Кроме того, при инкубации препарата фермента Xgh12 Y37V в течение 10 минут при 65 и 70°C, pH 5.0 сохраняется 80% и 28% ферментативной активности соответственно. У дикого варианта фермента Xgh12 при тех же условиях сохраняется 30% и 12% активности соответственно. Таким образом, выявлено, что мутация Y37V приводит к увеличению стабильности фермента Xgh12 и повышению максимума его активности.

Также определено, что максимум активности у фермента Egh12 V41S проявляется при 60°C, pH 4.6, а у дикого варианта – при 70°C, pH 4.6. Помимо этого, Egh12 V41S сохраняет значительно меньше ферментативной активности при 65 и 75°C – 14% и 3% соответственно, при этом Egh12 сохраняет 80% и 30% при тех же условиях.

В результате, показано, что валин в положении 41 у эндоглюканазы Egh12 из *T. terrestris* ассоциирован с высокой термостабильностью фермента. Благодаря введению мутации Y37V в аминокислотную последовательность ксилоглюканазы Xgh12 из *A. cervinus* удалось получить более термостабильный вариант белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1659).

Литература

1. Sandgren M, Ståhlberg J, Mitchinson C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes // Prog Biophys Mol Bio. 2005. V. 89. P. 246–291.
2. Rykov S.V. et. al. Unusual substrate specificity in GH family 12: structure-function analysis of glucanases

Bgh12A and Xgh12B from *Aspergillus cervinus*, and Egh12 from *Thielavia terrestris* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2022. V. 106. P. 1493–1509.

3. Rykov S.V. et. al. Novel endo-(1,4)- β -glucanase Bgh12A and xyloglucanase Xgh12B from *Aspergillus cervinus* belong to GH12 subgroup I and II, respectively // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. P. 7553–7566.

УДК 543.632.9

Определение 2-фенилэтиламина в темном шоколаде новой ВЭЖХ-МС/МС методикой **Ю.Д. Афанасьев¹, А.Ю. Алашеев¹, Юйчжэ Ван¹, Вэньюй Сюе¹, А.С. Леонова¹, Е.И. Марусич¹, С.В. Леонов¹**

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

2-фенилэтиламин (рис. 1) – природный алкалоид, который регулирует моноаминовую нейротрансмиссию и является стимулятором центральной нервной системы человека. Вещество вырабатывается при производстве ряда пищевых продуктов, в том числе шоколада, в процессе ферментации за счет декарбоксилирования фенилаланина [1, 2].

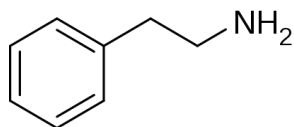


Рисунок 1. Химическая структура 2-фенилэтиламина

В работе рассмотрена разработка и валидация аналитической методики количественного определения 2-фенилэтиламина в темном шоколаде, представленном на Российском рынке, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с тандемным масс-спектрометрическим детектором. Пробоподготовка состояла из двух этапов: обезжиривания продукции гексаном с последующей сушкой шрота и экстракцией определяемого вещества смесью метанол:вода (80:20) под воздействием ультразвука. Хроматографическое разделение образцов проводили с использованием градиентного элюирования воды и ацетонитрила с добавлением 0.1% муравьиной кислоты на обращенно-фазовой колонке C18, время выхода аналита составило 1.37 минут с общим временем анализа 2.7 минут (рис. 2). В качестве источника ионов использовали электроспрей в положительном режиме, для детектирования фенилэтиламина использовали прекурсор-ион 122 m/z, соответствующий протонированной форме аналита, с последующей МС/МС фрагментацией и образованием осколка 105 m/z.

По результатам валидации предел количественного определения методики составил 60 мкг/кг темного шоколада; правильность (выраженная как степень сходимости) составила 96%, коэффициент вариации находился в диапазоне от 4.9 до 7.7 % в рамках исследования повторяемости; от 4.6 до 6.8% в рамках исследования воспроизводимости. Полученные аналитические характеристики методики подтвердили ее пригодность для точного количественного измерения 2-фенилэтиламина.

Методика была применена к анализу 26 коммерчески доступных образцов темного шоколада, по результатам исследования которых везде был обнаружен 2-фенилэтиламин, с наименьшим содержанием 1338 мкг/кг и наибольшим 4618 мкг/кг.

Полученные в ходе исследования результаты могут быть использованы при изучении диетического воздействия фенилэтиламина на человека, а также при контроле качества шоколадной продукции.

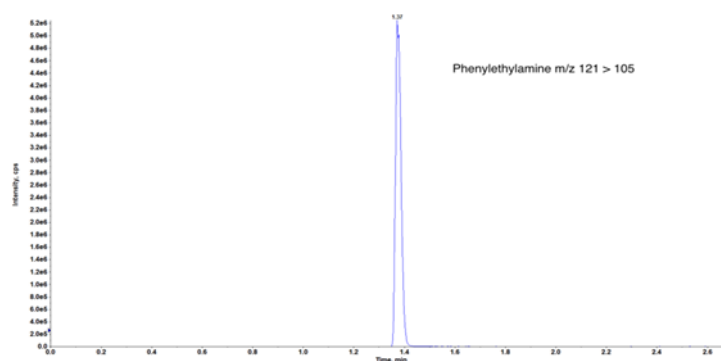


Рисунок 2. Хроматографический пик 2-фенилэтиламина

Литература

1. *Irsfeld M., Spadafore M., Prüß B.M.* β -phenylethylamine, a small molecule with a large impact. Webmedcentral, 2013. 4(9)
2. *Kau N., Kumari B.* Phenylethylamine: Health benefits—A review. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2016. 5: p. 743-750.

УДК 577.29

Сплит-система на основе биотин-лигазы TurboID для исследования окружения убиквитиновых цепей различного типа строения

А.М. Рыскина, А.А. Белогуров, А.А. Кудряева

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Убиквитин – небольшой глобулярный белок (около 8 кДа), задействованный во многих важных аспектах жизни клетки, таких как сортинг и деградация белков, аутофагия, репликация и репарация ДНК, регуляция клеточного цикла и участие в работе иммунной системы [1]. Убиквитинирование — присоединение к белку-субстрату молекулы убиквитина — отличается большой вариативностью за счет возможности образования убиквитином полимерных цепей с помощью изопептидных связей между их С-концом и свободной ϵ -аминогруппой одного из семи остатков лизина в составе убиквитина (K6, K11, K27, K29, K33, K48 и K63). Убиквитиновые цепи различаются по длине, строению (задействованным в образовании изопептидных связях остатков лизина) и типу ветвления. Определенные типы цепей кодируют конкретные сигналы и в контексте системы убиквитинирования ассоциированы с определенным набором ферментов, синтезирующих цепь (убиквитин-лигаз), субстратов и их рецепторов. Изучение ближайшего окружения убиквитиновых цепей различного строения может дать новую информацию об их биологической функции. В нашей работе для этой цели была применена сплит-система на основе биотин-лигазы TurboID [2]. Разделенная на два нефункциональных фрагмента (N-Turbo и C-Turbo), слитых с исследуемыми белками убиквитина, при образовании связи между ними лигаза восстанавливает свою активность и биотинилирует другие белки, находящиеся в непосредственной близости от сплит-системы (рис. 1, а). Анализ биотинилированных белков проводится методами иммуноблоттинга и масс-спектрометрического анализа обогащенной биотинилированными белками фракции [3]. На данный момент проведен иммуноблоттинг клеточных лизатов, содержащих различные варианты дизайна сплит-системы (рис. 1, б), а также проведен масс-спектрометрический анализ фракций, обогащенных биотинилированными белками, выделенных из соответствующих клеточных лизатов. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности сплит-системы на основе TurboID при детекции окружения убиквитиновых цепей дикого типа, что предполагает возможность изучения также и цепей конкретного строения.

Работа поддержана проектом РНФ № 21-74-10154

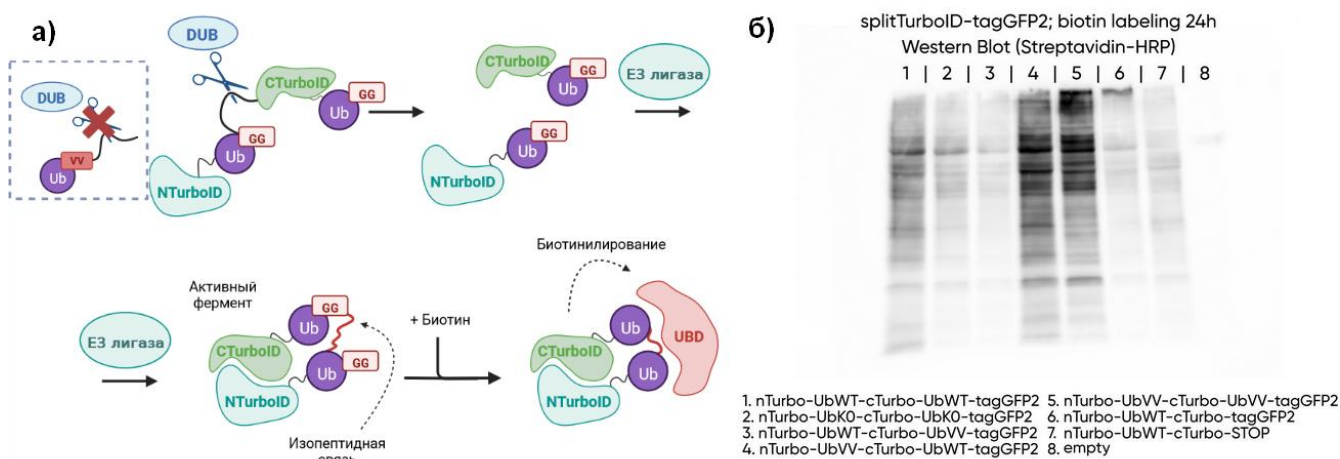


Рисунок 1. Принципиальная схема эксперимента (а) и результаты иммуноблоттинга различных вариантов конструкции сплит-системы (б)

Литература

1. Kwon Y.T., Ciechanover A. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. Trends Biochem Sci. 2017 Nov;42(11):873-886.
2. Cho K.F., Branon T.C., Rajeev S., Svinkina T., Udeshi N.D., Thoudam T., Kwak C., Rhee H.W., Lee I.K., Carr S.A., Ting A.Y. Split-TurboID enables contact-dependent proximity labeling in cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Jun 2;117(22):12143-12154.
3. Cho K.F., Branon T.C., Udeshi N.D., Myers S.A., Carr S.A., Ting A.Y. Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID. Nat Protoc. 2020 Dec;15(12):3971-3999.

УДК 620.3

Модифицированные наночастицы висмута для адресной доставки к опухолевым клеткам со сверхэкспрессией HER2 и фолатного рецептора

Н.А. Короткова^{1,2}, П.А. Котельникова², С. М. Деев^{1,2}

¹ Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ"

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Применение нанотехнологий для лечения и диагностики злокачественных опухолей обладает рядом преимуществ перед классическими подходами благодаря особым свойствам нанобъектов [1]. В настоящей работе рассматриваются наночастицы висмута (Ві), полученные методом лазерной абляции. Высокие коэффициенты поглощения в широком диапазоне длин волн и высокая эффективность фототермического преобразования наночастиц (НЧ) Ві делают их привлекательными для радио- и фотосенсибилизации [2, 3].

В воде и фосфатном буфере НЧ Ві нестабильны, что ограничивает их применение *in vivo*. Покрытие висмута полимерами позволяет не только достичь стабильности в физиологических условиях, но и сделать возможной конъюгацию с биомолекулами. В ходе работы были опробованы покрытия наночастиц силан-полиэтиленгликолем-СООН и хитозан олигосахарид лактатом. Поверхности наноструктур модифицировали нацеливающими агентами с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) для адресной доставки к раковым клеткам.

НЧ Ві, покрытые хитозан олигосахарид лактатом, модифицировали фолиевой кислотой. Данный лиганд обладает высоким сродством к фолатному рецептору, который сверхэкспрессируется на поверхности клеток нескольких видов рака [4]. Данные наночастицы добавляли к клеткам с разной экспрессией фолатного рецептора. По данным проточной цитометрии было определено специфичное связывание. Значения гидродинамических диаметров в фосфатном буфере для НЧ Ві, НЧ Ві-хитозан-олигосахарид лактат и Ві-хитозан-олигосахарид лактат-фолиевая кислота составили соответственно

497 ± 277 нм, 1232 ± 673 нм и 1029 ± 334 нм. Полученные наночастицы не пригодны для применения *in vivo* из-за своих размеров.

Для стабилизации и дальнейшей функционализации наночастицы висмута покрывали силан-полиэтиленгликолем-СООН. Рецептор эпидермального фактора роста человека (HER2) был выбран в качестве поверхностного опухолевого маркера, поскольку его сверхэкспрессия связана с более агрессивным течением болезни [5]. Наночастицы, покрытые полимером, модифицировали соответствующими нацеливающими лигандами: антителом Трастузумаб, каркасными белками DARPIn и аффибоди. Для отрицательного контроля использовали бычий сывороточный альбумин. Карбоксильная группа полимера способствовала присоединению аминокислотной группы белка-мишени. Гидродинамический диаметр покрытых НЧ составил 68 ± 20 нм фосфатном буфере. Покрытие полимером стабилизировало висмут в воде и фосфатно-буферном солевом растворе. Связывание модифицированных наночастиц с клетками, имеющими различную экспрессию HER2, оценивали методом проточной цитометрии. Данные свидетельствуют об успешном соединении адресных НЧ с HER2-положительными клетками. Отношения эффективности связывания для клеток с высокой экспрессией HER2 (BT474) к клеткам MDA-MB-231 (низкий уровень экспрессии) составляют для частиц, модифицированных трастузумабом – 2,66 ± 0,66 раз; DARPIn 9_29 – 4,56 ± 1,53 раз; аффибоди – 1,59 ± 0,03 раз, альбумином – 0,25 ± 0,13 раз (отрицательный контроль). Результаты МТТ анализа для висмута, покрытого силан-полиэтиленгликолем-СООН, свидетельствуют о токсичности данных наночастиц, связанной с высвобождением ионов висмута. Для дальнейших применений *in vivo* ведется работа по оптимизации покрытия наночастиц с целью снижения токсичности висмута.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-14-00112.

Литература

1. Klochkov S.G. et al. Implications of nanotechnology for the treatment of cancer: Recent advances //Seminars in cancer biology. Academic Press, 2021. Т. 69. С. 190-199.
2. Bulmahn J.C. et al. Laser-ablative synthesis of stable aqueous solutions of elemental bismuth nanoparticles for multimodal theranostic applications //Nanomaterials. 2020. Т. 10. №. 8. С. 1463.
3. Shahbazi M.A. et al] The versatile biomedical applications of bismuth-based nanoparticles and composites: therapeutic, diagnostic, biosensing, and regenerative properties //Chemical Society Reviews. 2020. Т. 49. №. 4. С. 1253-1321.
4. Bahrami B. et al. Folate-conjugated nanoparticles as a potent therapeutic approach in targeted cancer therapy //Tumor Biology. 2015. Т. 36. С. 5727-5742.
5. Mitri Z., Constantine T., O'Regan R. The HER2 receptor in breast cancer: pathophysiology, clinical use, and new advances in therapy //Chemotherapy research and practice. 2012. Т. 2012.

УДК 577.29

Влияние спермина на активность протеасомы и ее субъединичный состав

Саратов Г.А.^{1,2}, Кудряева А.А.², Белогуров А.А.²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Практически каждая живая клетка содержит полиамины в миллимолярных концентрациях, они участвуют в важнейших клеточных процессах [1]. Природные полиамины – спермидин и спермин представляют собой поликатионы с тремя и четырьмя аминокислотными группами соответственно. Ранее было показано, что они могут повышать активность различных ферментов [2] и действовать как химический шаперон [3]. Также известно, что белки, обогащенные основными аминокислотами, такими как аргинин и лизин, могут напрямую связываться с протеасомой [4, 5] и способны к дальнейшей транслокации в протеолитическую полость [6, 7]. В нашей работе мы исследовали влияние спермина на модуляцию активности протеасом и их субъединичный состав. 20S протеасома – мультисубъединичный протеиназный комплекс, способный связываться с одной или двумя 19S регуляторными частицами, образуя соответственно 26S и 30S протеасомы. Протеасомы обладают тремя типами активности: химотрипсин-подобной, трипсин-подобной и каспазоподобной. Наши данные свидетельствуют о том, что в буфере, имитирующем физиологические (внутриклеточные) условия *in vitro*, спермин увеличивает химотрипсин-подобную активность 20S протеасомы более чем

в десять раз. Анализ активности проводили по детекции прироста интенсивности флуоресценции при гидролизе протеасомой модельного субстрата Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC. Активирующая способность спермина может быть обусловлена координацией тирозина субстрата, после которого идет расщепление. Однако, в случае 26S протеасомы, влияние спермина не так сильно выражено.

Результаты наших исследований на клеточных линиях MCF7 и SH-SY5Y показывают уменьшение количества 26S/30S и накопление 20S протеасом при добавлении на 8 часов физиологических концентраций спермина в ростовую среду DMEM (рис. 2). Также нами были получены протеомные данные клеток, обработанных 1мМ спермина в течение 8 часов. Масс-спектрометрический анализ этих образцов позволяет предположить, что такой эффект на субъединичный состав протеасом опосредован оверэкспрессией PSMD5, белка, препятствующего сборке 26S/30S протеасом. Исследование выполнено при поддержке проекта Российского научного фонда №21-74-10154.

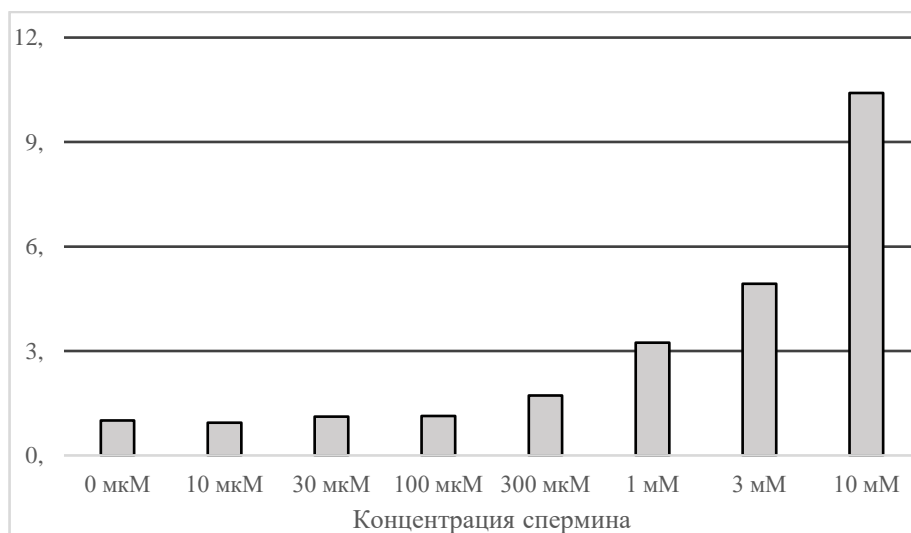


Рисунок 1. Увеличение химотрипсин-подобной активности протеасомы различными концентрациями спермина в буфере, имитирующем внутриклеточные условия.

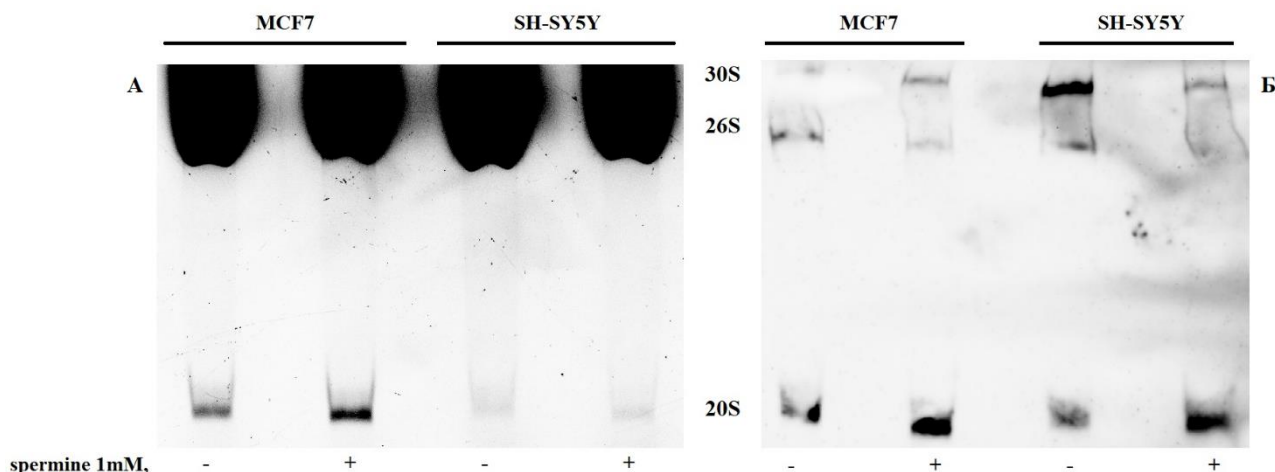


Рисунок 2. (А) Нативный электрофорез в ПААГ лизатов клеток линий MCF7 и SH-SY5Y, обработанных флуоресцентным субстратом протеасомы Me₄BodipyFL-Ahx₃Leu₃VS, обработанных и необработанных спермином (Б) Вестерн-блоттинг с использованием антител против альфа-субъединицы протеасомы PSMA2

Литература

1. *Russell D.H.* Clinical relevance of polyamines // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1983, 18, p. 261–311.
2. *Farhadian S., Shareghi B., Saboury A.A.* Exploring the thermal stability and activity of alpha-chymotrypsin in the presence of spermine // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2017, 35, p. 435–448.
3. *Singh B.P., Saha I., Nandi I., Swamy M.J.* Spermine and spermidine act as chemical chaperones and enhance chaperone-like and membranolytic activities of major bovine seminal plasma protein, PDC-109 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, 493, p. 1418–1424.

4. Kudriaeva A., Kuzina E.S., Zubenko O., Smirnov I.V., Belogurov A. Jr. Charge-mediated proteasome targeting // *FASEB J.* 2019, 33, p. 6852–6866.
5. Kuzina E., Kudriaeva A., Smirnov I., Dubina M.V., Gabibov A., Belogurov A. Jr. Glatiramer acetate and nannoy proteins restrict access of the multiple sclerosis autoantigen myelin basic protein to the 26S proteasome // *Biomed. Res. Int.* 2014, p. 926394.
6. Belogurov A.Jr., Kudriaeva A., Kuzina E., Smirnov I., Bobik T., Ponomarenko N., Kravtsova-Ivantsiv Y., Ciechanover A., Gabibov A. Multiple sclerosis autoantigen myelin basic protein escapes control by ubiquitination during proteasomal degradation // *J. Biol. Chem.* 2014, 289, p. 17758–17766.
7. Kuzina E.S., Chernolovskaya E.L., Kudriaeva A.A., Zenkova M.A., Knorre V.D., Surina E.A., Ponomarenko N.A., Bobik T.V., Smirnov I.V., Bacheva A.V., et al. Immunoproteasome enhances intracellular proteolysis of myelin basic protein // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2013, 453, p. 300–303.

УДК 543.51

Исследование содержания фосфорилированного бета-амилоида в мозге мышей 5xFAD

**К.В. Даничкина^{1,2}, П.А. Стрельникова^{2,3}, М.И. Индейкина², А.Е. Бугрова²,
А.С. Кононихин^{2,3}**

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

³Сколковский институт науки и технологий

Болезнь Альцгеймера (БА) – хроническое нейродегенеративное заболевание, ассоциированное с накоплением в тканях головного мозга неправильно сложенных амилоидных пептидов (Аβ). Известно более 100 различных вариантов модификаций Аβ пептидов, назначение большинства из которых изучено слабо [1]. В последнее время особое внимание уделяется исследованию неканонических протеоформ амилоида, а также их роли в патогенезе БА.

Одной из модификаций Аβ, встречающихся в патогенных агрегатах, является фосфорилирование по остаткам серина. Было замечено, что фосфорилированный серин в позиции 8 повышает стабильность амилоидных агрегатов, усиливая их устойчивость к деградации ферментами и клетками микроглии [2]. Содержание пептидов p-Ser-8-Аβ повышается на более поздних стадиях БА [3, 4], при этом формируются агрегаты с повышенной нейротоксичностью. Таким образом, количество фосфорилированного амилоида в тканях мозга изменяется с течением БА и может рассматриваться как маркер степени тяжести заболевания.

В связи с тем, что пожилой возраст является одним из факторов риска развития БА, было выдвинуто предположение о наличии корреляции между накоплением фосфорилированного амилоида в ткани мозга и возрастом. В качестве объекта исследования были выбраны трансгенные мыши 5xFAD в возрасте от 3 до 23 месяцев, для которых характерно появление церебральных агрегатов Аβ с последующим снижением когнитивных функций. Для выделения амилоида из кислото-растворимой фракции гомогената мозга была использована твердофазная экстракция. Контроль содержания p-Ser-8-Аβ, а также общей фракции Аβ-пептидов, осуществлялся при помощи вестерн-блот анализа. Кроме того, был проведён масс-спектрометрический анализ фосфорилированной формы Аβ.

В результате проделанной работы было выявлено увеличение количества p-Ser-8-Аβ с повышением возраста модельных животных. Обнаруженная зависимость открывает возможности для дальнейшего изучения роли p-Ser-8-Аβ в патогенезе БА, в частности, для оценки терапевтического потенциала фосфорилированной формы амилоида. Модулирование фосфорилирования Аβ может рассматриваться как перспективный механизм для предотвращения или замедления развития когнитивных нарушений.

Литература

1. Busch L., Eggert S., Endres K., Bufe B. The Hidden Role of Non-Canonical Amyloid β Isoforms in Alzheimer's Disease. — *Cells*, 2022 11(21):3421.

2. Kumar S., Singh S., Hinze D., Josten M., Sahl H.G., Siepmann M., Walter J. Phosphorylation of amyloid- β peptide at serine 8 attenuates its clearance via insulin-degrading and angiotensin-converting enzymes. — *J. Biol. Chem.*, 2012. 287, 8641–8651
3. Ashby E.L., Miners J.S., Kumar S., Walter J., Love S., Kehoe P.G. Investigation of Abeta phosphorylated at serine 8 (pAbeta) in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and vascular dementia. — *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2015. 41, 428–444
4. Upadhaya A.R., Kosterin I., Kumar S., Arnim C., Yamaguchi H., Fändrich M., Walter J., Thal D.R. Biochemical stages of amyloid- β peptide aggregation and accumulation in the human brain and their association with symptomatic and pathologically preclinical Alzheimer's disease. — *Brain*. 2014; 137(Pt 3):887-903

УДК 533.922

Рациональное укорачивание днк-аптамера с помощью методов молекулярного моделирование

И.А. Щугорева^{1,2}, П.В. Артюшенко^{1,2,3}, Р.В. Морячков¹, А.С. Кичкайло^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»

²Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого

³Сибирский федеральный университет

Аптамеры представляют собой короткие одноцепочечные олигонуклеотиды (ДНК, РНК), которые могут с высокой аффинностью и специфичностью связываться с широким кругом мишеней благодаря образованию уникальной трехмерной структуры. Обычно аптамеры состоят из 80–100 нуклеотидов и имеют большое разнообразие пространственных структур. Однако не все нуклеотиды играют решающую роль в связывании. Основная часть, взаимодействующая с мишенями, обычно имеет длину 10-15 нуклеотидов и формирует несколько основных мотивов: петли, шпильки, G-квадруплекс, или псевдоузлы [1]. Сохранение этих мотивов и удаление ненужных нуклеотидов может значительно повысить аффинность связывания, селективность и снизить стоимость синтеза аптамеров. Целью исследования было моделирование пространственной структуры аптамера Gli-55, определение основных структурных мотивов возможных конформеров и отсечение ненужных нуклеотидов.

Исследуемый аптамер Gli-55 состоит из 60 нуклеотидов: 5' GTCCGGTTCA CCTCTAGCAT TCCTGGCGTT ATTAACGGAG CAGTCCTGTG GAGTGGGTGA-3'. На основе его последовательности в программе Mfold были смоделированы вторичные структуры, в том числе и структура, содержащая G-квадруплекс, поскольку аптамер богат гуанинами. Далее были смоделированы пространственные структуры и проведены молекулярно-динамические (Amber14sb/TIP3P) и квантово-химические (FMO/DFTB3/PCM) расчеты. Для выявления наиболее вероятной конформации аптамера в растворе, полученные структуры сравнивали с данными малоуглового рентгеновского рассеяния. По результатам сравнения наименьшее отклонение от эксперимента (χ^2) имели модель 1 и 4 (рис. 1).

Так как отклонение от эксперимента для обеих моделей близко, опираясь только на данные МУРР невозможно точно определить, какая именно из конформаций присутствует в растворе. Поскольку квадруплекс обладает хиральностью, был снят спектр кругового дихроизма (КД) (рис. 2). Из спектра КД (рис. 3) видно, что Gli-55 имеет пики при 220 и 280 нм, что не характерно ни для одной формы квадруплекса.

Исходя из представления о том, пространственная форма аптамера определяет его связывающую способность с мишенями, необходимо было провести обрезку аптамера таким образом, чтобы основные структурные мотивы сохранились. Так исследуемый аптамер Gli-55, состоящий из 60 нуклеотидов был усечен до 35 нуклеотидов. На основе вторичной структуры модели 1, была отрезана та часть, которая содержит наименьшее количество комплементарных пар (с 1-го по 25-й нуклеотид) (рис. 3). Такой подход обоснован тем, что дуплексная часть аптамера достаточно жесткая и мало

подвержена изменениям, в отличие от одинарной нити нуклеотидов. В результате был получен аптамер Gli-35. Его вторичная структура соответствовала обрезанной части полноразмерного аптамера.

Далее, методом проточной цитометрии, было определено количество связанных клеток для исходного полноразмерного аптамера Gli-55 и его укороченной версии Gli-35 (рис. 3).

По полученным данным видно, что связывающая способность аптамера Gli-35 близка к аптамеру Gli-55, что косвенно может указывать на то, что вторичная и третичная структуры были определены верно.

Таким образом, совместное применение методов компьютерного моделирования и экспериментальных данных МУРР и КД, дает возможность получения более коротких олигонуклеотидов, при этом сохраняющих аффинность и специфичность их длинных предшественников.

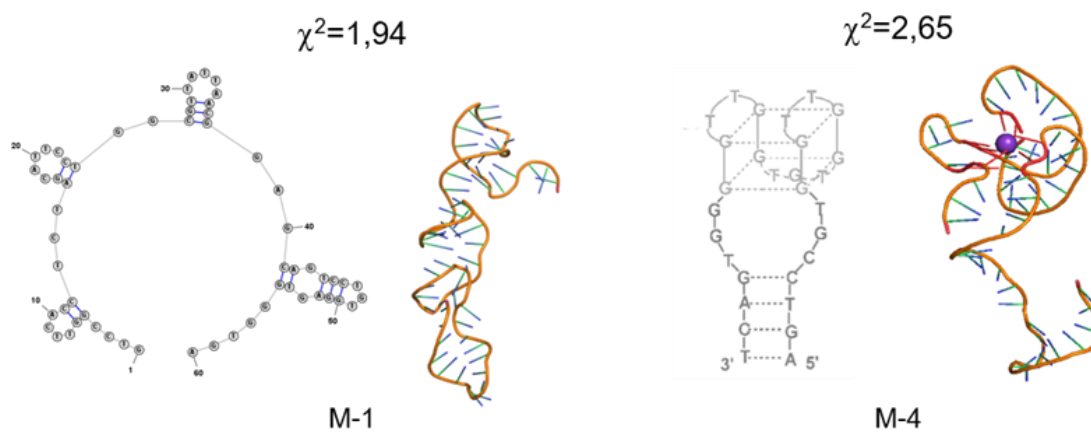


Рисунок 1. Вторичные и пространственные структуры аптамера Gli-55

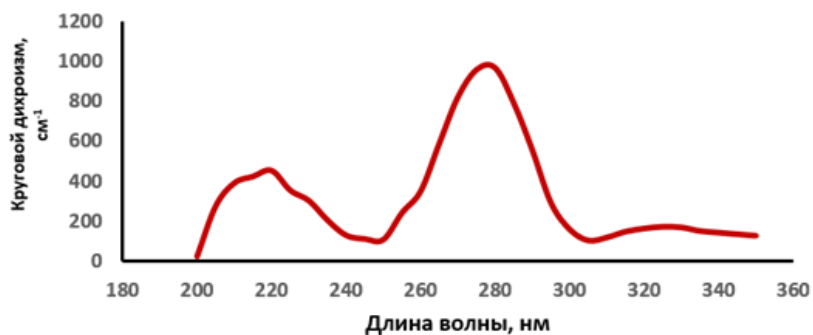


Рисунок 2. Спектр КД Gli-55

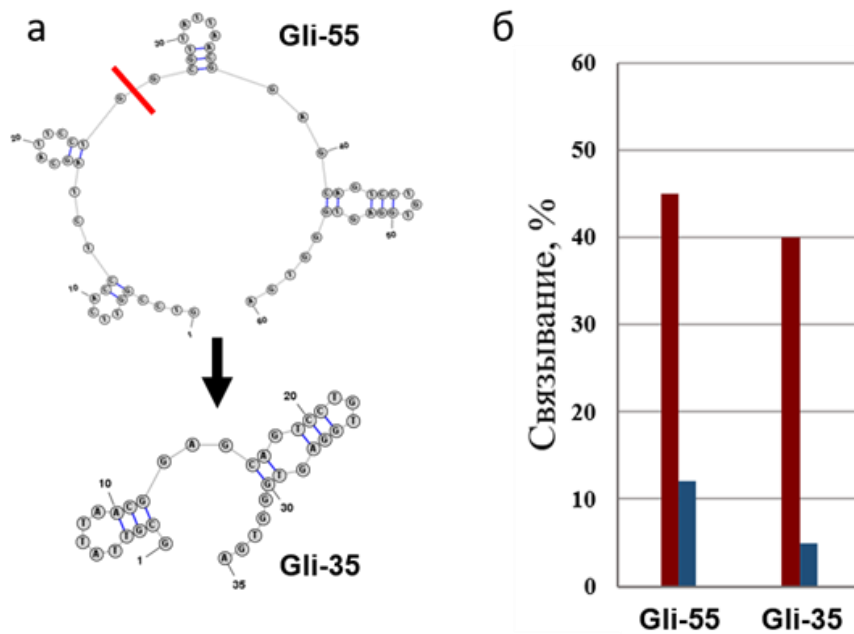


Рисунок 3. а) Вторичные структуры Gli-55 и Gli-35. б) Данные проточной цитометрии. Красный-клетки глиобластомы, синий – здоровые клетки и клетки других типов опухолей

Литература

1. Gold L., Polisky B., Uhlenbeck O., et al. Diversity of oligonucleotide functions // Annu. Rev. Biochem. 1995. V. 64. P. 763-797.

Surface modification of fibroblasts with peroxiredoxin-1-loaded polymeric microparticles increases cell mobility, resistance to oxidative stress and collagen I production

N. Shen¹, X. Qi¹, D.V. Bagrov^{2,3}, M.G. Sharapov⁴, M.O. Durymanov¹

¹Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)

²Faculty of Biology, Moscow State University

³Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

⁴Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

Cell-based therapy utilizes live cells to treat different pathologies including cancer, tissue injuries, degenerative, inflammatory, and metabolic diseases [1]. There are different types of cells that have been used as non-genetic cell engineering including stem cells, macrophages, neutrophils, red blood cells, natural killer cells and T-cells [2,3]. Here, we translated the principle of non-genetic cell engineering to fibroblasts, which produce extracellular matrix (ECM) components and paracrine factors, such as cytokines and growth factors [4]. In this study, we covalently attached poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles loaded with peroxiredoxin-1 (Prx1) to the surface of fibroblasts (Fig. 1). Prx1 is a multifunctional protein, which is normally expressed intracellularly and plays a dual role of molecular chaperone and peroxidase. We found that released Prx1 from PLGA microparticles maintains its signaling activity. Functionalization of fibroblasts with PLGA/Prx1 microparticles via EDC/sulfo-NHS coupling reaction did not affect cell viability but increased cell migratory properties and collagen I production. Moreover, PLGA/Prx1 backpacks increased resistance of fibroblasts to oxidative stress and attenuated cell senescence (Fig. 2). In summary, we have developed a novel approach of fibroblast modification to augment their biological properties, which can be desirable for wound repair, cosmetic dermatology, and tissue engineering.

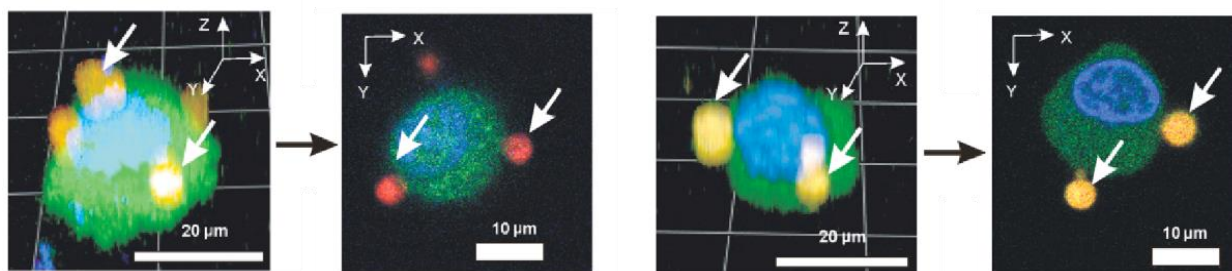


Figure 1. Confocal laser scanning microscopy was used to confirm lack of microparticle internalization and their attachment to the cell surface. As shown in 3D views and XY optical sections of two representative 3T3 cells, the fibroblasts (green cytoplasm and blue nuclei) bear PLGA/Prx1-Cy3 backpacks (red) on the surface.

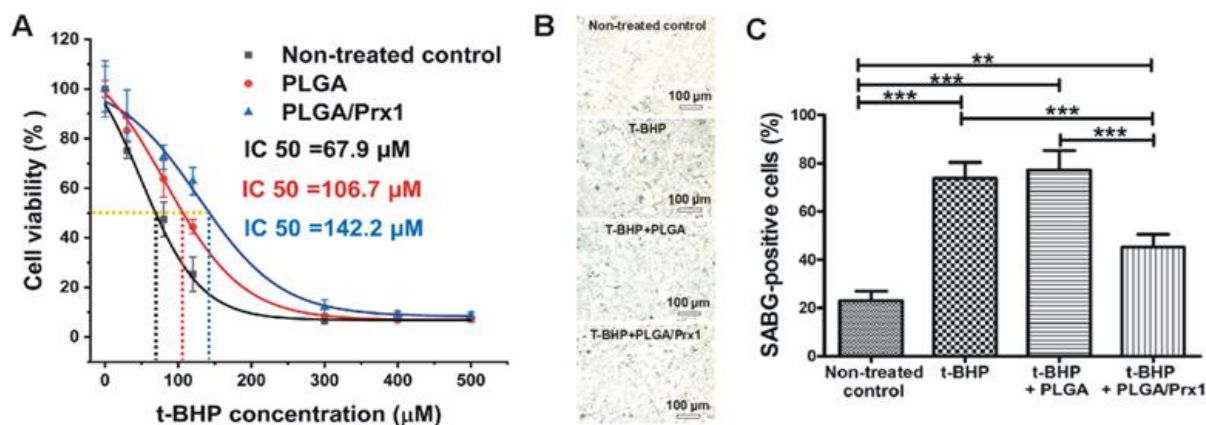


Figure 2. Protective effects of PLGA/Prx1 backpacks under oxidative stress. (A) MTT assay was used to obtain and compare viability curves for unmodified, PLGAmodified and PLGA/Prx1-modified 3T3 cells at different t-BHP concentrations after 48 h of incubation. (B) To determine SA-β-Gal positive cell number upon tBHP exposure, unmodified or microparticle functionalized 3T3 cells were stained with X-gal and photographed. (C) Quantitative analysis of the images indicated decreased number of SA-β-Gal positive cells in case of PLGA/Prx1 surface modification as compared with unmodified fibroblasts treated with t-BHP.

References

1. Cuende N., Rasko J.E., Koh M.B., Dominici M., Ikononou L. Cell, tissue and gene products with marketing authorization in 2018 worldwide// *Cytotherapy*. – 2018. – T. 20. – p. 1401–1413.

2. Dapkute D., Pleckaitis M., Bulotiene D., Daunoravicius D., Rotomskis R., Karabanovas V. Hitchhiking nanoparticles: mesenchymal stem cell-mediated delivery of theranostic nanoparticles// ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2021. – T. 13. – p. 43937–43951.

3. Gao Z., Zhang L., Hu J., Sun Y. Mesenchymal stem cells: a potential targeted delivery vehicle for anti-cancer drug loaded nanoparticles// Nanomed. Nanotechnol., Biol. Med. – 2013. – N 9. – p. 174–184.

4. Sorrell J.M., Caplan A.I. Fibroblasts—a diverse population at the center of it all// Int. Rev. Cell Mol. Biol. – 2009. – N 276. – 161–214.

УДК: 57.021

Influence of biologically active substances on the accumulation of lipids and protein carbonyls in aging nematodes (*Caenorhabditis elegans*)

S.S. Salimon¹, E.I. Marusich¹, S.V. Leonov^{1,2}

¹School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology

²Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences

Aging is an intricate process which is impacted by various genetic and environmental conditions. As a result, anti-aging medicine development is seen as being unrealistic. Nonetheless, scientific proof that pharmacological intervention in the aging process is possible has been offered by recent enthusiastic studies on aging [1-3]. Aging results from the accumulation of a wide variety of molecular and cellular damage over time including but not limited to lipofuscin, lipid and protein carbonyl accumulation [3]. Previous reports suggest that a variety of bioactive compounds and plant extracts can significantly lengthen the lives of mammals and invertebrates.

In this study, we evaluated the geroprotective effect of 10 biologically active substances (BAC, including – rutin, squalene, kaempferol, biohanin A, urosolic acid, chlorogenic acid, baicalin, mangiferin, quercetin and trans-cinnamic acid) and 5 crude extracts isolated from medicinal plants - *Ginkgo biloba*, *Pulmonaria officinalis*, *Scutellaria baicalensis*, *Hedysarum neglectum* and *Panax ginseng* from the Altai Region, Russia. The assessment was focused on their influence on lipid and protein carbonyl accumulation using *Caenorhabditis elegans* model. Gravid nematodes were synchronized, seeded and then exposed to various concentrations of each BAC (200 μM, 100 μM, 50 μM and 10 μM) and extract ($\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{1000}$) in triplicates. Labelling was achieved using BODIPY 505/515 and Cy3-NHS ester whereas image analysis was accomplished with the aid of ImageXpress Micro Widefield High Content Screening System (Molecular Devices) and Operetta CLS High Content Analysis System (Perkin Elmer) for the lipid and protein carbonyl accumulation respectively.

The decrease in lipid accumulation were notable in nematodes treated with 50 μM of rutin (35.90%), 200 μM (42.73%) and 50 μM (53.12%) of trans-cinnamic acid (Fig. 1); 200, 100 and 50 μM of mangiferin (Fig. 2) as well as the 1000x concentration of *Ginkgo biloba* (46.37%). Furthermore, the accumulation of protein carbonyl was reversed by the 50 μM of kaempferol (Fig. 3) as well as the 10x concentrations of *P. officinalis* and *S. baicalensis* (Fig. 4) to levels that were statistically comparable with the positive control. Thus, the molecular mechanism of action of these BACs that mitigated the accretion of lipids and protein carbonyl can be studied further as they may serve as an excellent precursor for the chemosynthesis of anti-aging drugs which can be useful for healthy living in aged-people. Therefore, they could be harnessed towards the realization of the UN Decade of Healthy Aging plan to ensure the retention of functional capacity well into old age.

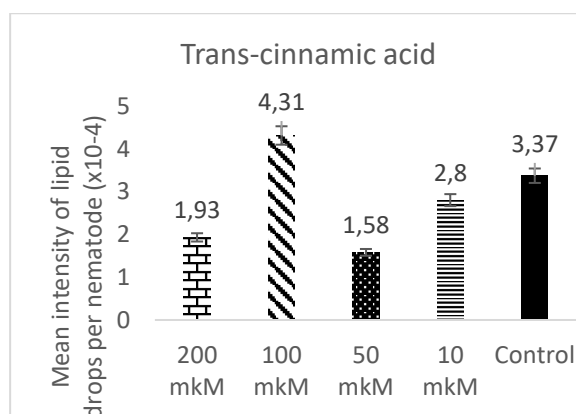


Figure 1: Lipid accumulation was mitigated by 42.73 and 53.12% at 200 and 50 μM respectively

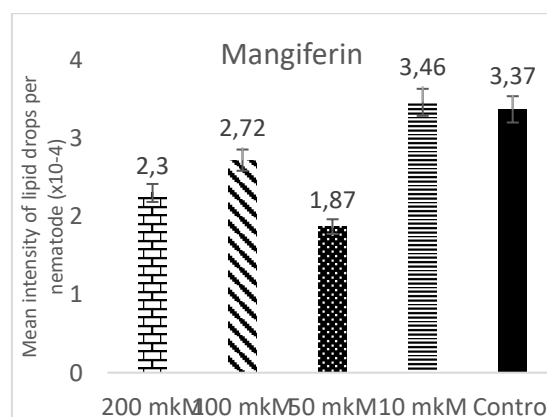


Figure 2: The 200, 100 and 50 μM of mangiferin decreased the intensity of lipid drops

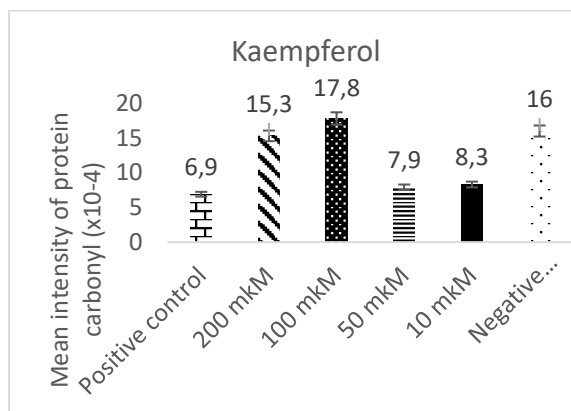


Figure 3: Protein carbonyl content at 50 µM was comparable with the positive control

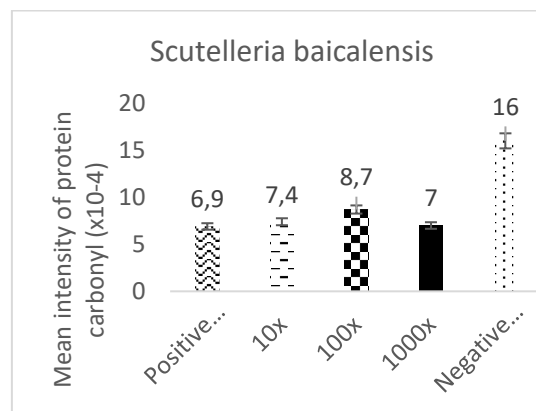


Figure 4: Protein carbonyl accumulation was ameliorated at all doses investigated

References

1. Hoon J., Dong S.C. Anti-aging properties of *Ribes fasciculatum* in *Caenorhabditis elegans*. Chinese Journal of Natural Medicines. – 2016. – 14(5). – p. 335-342.
2. Xiaojuan L., Xiaofeng C., Han L., Yong C. Antioxidation and anti-aging activities of astaxanthin geometrical isomers and molecular mechanism involved in *Caenorhabditis elegans*. Journal of Functional Foods. – 2018. – N44. – p. 127-136.
3. Le V.M., El A.K.M. Effects of bioactive substances isolated from Siberian medicinal plants on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Foods and Raw materials. – 2022. – 10(2). – p. 340-352.

УДК 577.29

Разработка технологии сортировки и доставки РНК во внеклеточных везикулах с белками слияния к целевым клеткам

Д.А. Владимирцев, И.В. Зубарев

Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

В данной работе рассмотрен механизм адресной доставки и сортировки РНК во внеклеточных везикулах к целевым клеткам. На основе механизма сборки и упаковки вирусных частиц, предложена уникальная система, которая обладает низкой иммуногенностью, в отличие от технологии вирусной доставки геннотерапевтических конструкций. Помимо этого, рассматриваемая система обладает высокой степенью специфичности, благодаря использованию вирусного белка слияния с целевыми клетками.

Основными компонентами системы являются белок слияния, вирусный сигнал упаковки (ψ -сигнал) и вирусный белок, необходимый для упаковки вирусной РНК при помощи ψ -сигнала. В качестве белка слияния в экспериментах использовался белок синцитин-1 (ERVW-1, Gene ID: 30816), который высоко экспрессируется в плаценте человека. ERVW-1 был получен методом синтеза гена. В качестве вирусного сигнала упаковки использовался ψ -сигнал вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Такой участок расположен в 5' нетранслируемой области (5'-НТО) вирусного генома, однако в экспериментах была использована как целая 5'-НТО, так и укороченная её версия, повсеместно используемая в трансфер-плазмидах для сборки лентивирусов. В качестве последнего элемента системы использовался gag-белок ВИЧ, который обладает высокой аффинностью к ψ -сигналу [1]. В качестве репортерной РНК используется матричная РНК зеленого флуоресцентного белка GFP. Ее выбор во многом обусловлен простотой детекции сигнала.

Сборка везикул, несущих на своей поверхности синцитин-1, внутри которых находится целевая РНК, происходит в клеточной линии аденокарциномы протоков молочной железы человека MCF7. В данной клеточной линии посредством лентивирусной трансдукции стабильно экспрессируется белок gag и белок синцитин-1. Таргетная РНК, несущая на себе также участок ψ -сигнала, вносится в клеточную линию MCF7 посредством липофекции препаратом Lipofectamine-2000. Через день после сборки везикул в клеточной линии MCF7, они собираются и наносятся на клетки колоректальной аденокарциномы HT29. Выбор данной клеточной линии в качестве целевых клеток обусловлен высокой экспрессией на их поверхности белка ASCT2 (Gene ID: 6510), который обладает высоким сродством к синцитину [2].

На первом этапе работы продемонстрирована работоспособность системы при помощи транзientной экспрессии белков gag и синцитин-1, а также целевой матричной РНК GFP в клеточной линии MCF7. После нанесения наработанных везикул на клеточную линию колоректальной аденокарциномы HT29 были обнаружены клетки, экспрессирующие GFP, что является прямым доказательством сборки везикул правильного состава и успешное их слияние с целевыми клетками.

Уникальность разработанной системы состоит во многом в технологии сортировки и упаковки РНК во внеклеточные везикулы. Ключевым преимуществом разработанной системы является большая ёмкость упаковываемой мРНК, ограниченная только размером внеклеточной везикулы. Стоит подчеркнуть, что упаковка целевой РНК происходит напрямую в клеточной линии MCF7 без постороннего (внешнего) вмешательства. Причем в везикулу может попасть лишь только РНК, имеющая ψ -сигнал, то есть только таргетная РНК. Эта система, на данный момент, не имеет аналогов и представляет главную ценность настоящей работы.

Литература

1. Freed, E. HIV-1 assembly, release and maturation // Nat. Rev. Microbiol. – 2015. – V. 13. – p. 484–496.
2. Štafl, K., Trávníček, M., Kučerová, D. et al. Heterologous avian system for quantitative analysis of Syncytin-1 interaction with ASCT2 receptor // Retrovirology. – 2021. – V. 18.

УДК 576.52

NanoMOFs with Encapsulated Photosensitizer: Accumulation in *Chlamydia trachomatis* Inclusions and Antimicrobial Effects

X. Qi¹, E.N. Grafskaya², N. Shen¹, A.G. Masyutin^{3,4}, M.V. Erokhina^{3,4}, V.N. Lazarev², M.O. Durymanov^{1,3}

¹ School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology

² Gene Engineering Lab, Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine

³ Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University

⁴ Central TB Research Institute

The treatment of intracellular bacterial infections, such as *Chlamydiae*, is still challenging because invasion of these pathogens to the host cells provides their protection from the host immune system and antibacterial drugs. The major problem for the treatment of *C. trachomatis* infection is the ability of this parasite to transform into a metabolically inactive persistent form, called “aberrant RB”, upon the treatment with antibiotics (penicillin), gamma-interferon (IFN γ), or essential nutrient deprivation. However, *Chlamydia* restart proliferation and dissemination after elimination of stressful stimuli [1]. Therefore, development of novel antibacterial drugs and antimicrobial drug delivery platforms is crucial for circumventing the defense mechanisms of *C. trachomatis*. The use of nanoparticles as drug delivery systems for the treatment of intracellular bacterial infections is an attractive strategy [2,3]. Metal-organic framework nanoparticles (nanoMOFs) are a promising class of hybrid nanomaterials for biomedical applications. Due to high drug loading capacity and fast internalization kinetics nanoMOFs are more beneficial for the treatment of intracellular bacterial infections as compared with free antibacterial drugs, which poorly accumulate inside the cells because of inability to cross membrane barriers or low intracellular retention.

Here, we evaluated feasibility of the mesoporous iron (III)-based MIL-100(Fe) (MIL stands for “Materials of Institute Lavoisier”), a biodegradable nanoMOFs, as drug delivery carriers for treatment of chlamydial infections. This study shows the availability of MIL-100(Fe) nanoparticles to co-localize with *Chlamydia trachomatis* in the infected RAW 264.7 macrophages, as shown in TEM-EDX analysis (Fig. 1), indicating that these nanoparticles can be used as a drug delivery platform for different antibacterial agents that provides enhanced therapeutic effect against intracellular *C. trachomatis*. Simultaneous infection and treatment of RAW 264.7 cells with empty nanoMOFs result in 3-fold decrease in bacterial load that indicates intrinsic anti-chlamydial effect of this iron-containing nanomaterial. Furthermore, nanoMOFs loaded with photosensitizer methylene blue (MB) exhibit significant photodynamic inactivation of *Chlamydia trachomatis* in the infected cells resulting in 2-order bacterial burden decrease in comparison with non-treated infected control (Fig. 2). Thus, our findings suggest the use of Fe nanoMOFs as a promising drug delivery platform, which contributes to antibacterial effect, for the treatment of chlamydial infections.

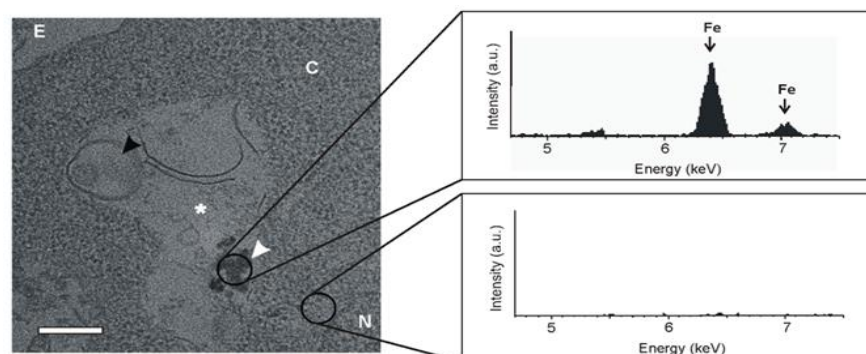


Figure 1. Co-localization of MIL-100(Fe) nanoparticles with *C. trachomatis* ERs within inclusions in RAW 264.7 cells and EDX spectrum analysis showing two major peaks of iron at 6.5 and 7.1 keV from the area with nanoMOFs. The peaks are not

detected from the area without nanoparticles. Black and white arrowheads indicate chlamydial ERs and MIL-100(Fe) nanoparticles, respectively. White stars indicate chlamydial inclusions. Abbreviations: N, nucleus; C, cytosol; E, extracellular space. Scale bar is 500 nm.

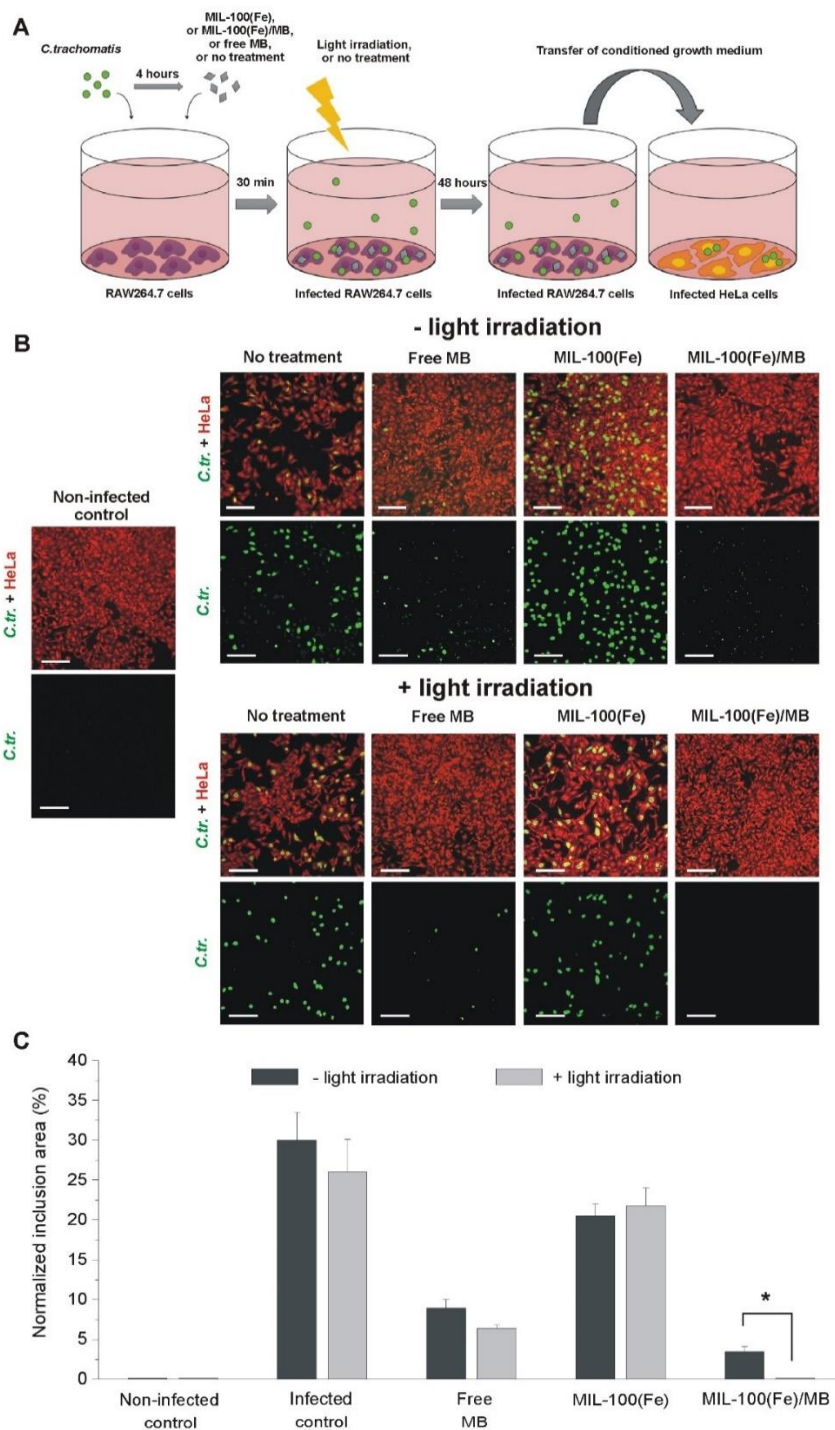


Figure 2. Photodynamic effect of MB-loaded nanoMOFs in *C. trachomatis*-infected RAW 264.7 macrophages. (a) The scheme of the experiment with secondary infection of HeLa cells to determine infectivity of conditioned growth medium from infected RAW 264.7 macrophages treated with different formulations, followed by light irradiation. (b) Images of HeLa cells after incubation with conditioned growth medium from infected and treated or control RAW 264.7 cells (red). Infected HeLa cells were visualized by staining with FITC-labeled monoclonal antibodies against chlamydial major outer membrane protein. (green). Scale bar is 50 μ m. (c) Analysis of secondary infection efficacy. To quantify infection rate in HeLa cells, we normalized area of inclusions on area of HeLa cells. Data are shown as means \pm SD. * p < 0.05, Mann-Whitney U test.

References

1. Panzetta M. E., Valdivia R.H., Saka H.A. Chlamydia persistence: A survival strategy to evade antimicrobial effects in-vitro and in-vivo // Front. Microbiol. – 2018. – V. 9. – p. 3101.
2. Abed N., Couvreur P. Nanocarriers for antibiotics: a promising solution to treat intracellular bacterial infections // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2014. – V. 43. – p. 485-496.
3. Ladavière C., Gref R. Toward an optimized treatment of intracellular bacterial infections: input of nanoparticulate drug delivery systems // Nanomedicine (Lond). – 2015. – V. 10. – p. 3033-3055.

Investigation of Non-Small Cell Lung Cancer Organoid Morphology and Drug Sensitivity*L. Ismail, A. Mezentsev, M. Durymanov*

Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)

Non-small-cell lung cancer (NSCLC) is one of the major contributors to cancer deaths across the globe [1]. Adjuvant chemotherapy is a widely used approach for treating stages II and III non-small cell lung cancer, both before and after surgical removal of the tumor. These tumors are heterogenous in nature and may become resistant to multiple drugs, meaning certain cells within the tumor are no longer affected by chemotherapy. Currently, there is a multiple choice of chemotherapeutic drug combinations specifically for late-stage NSCLC patients [2].

Three-dimensional models of malignant tumors made from a patient's biopsy, known as cancer organoids, have emerged as a promising tool for drug screening and personalized treatment of NSCLC. These organoids can preserve the structural, morphological, and cellular features of the parental tumor, making them a valuable resource for predicting the efficacy of chemotherapeutic agents and identifying optimal treatment options for individual patients [3]. Compared to two-dimensional cell cultures, 3D-cancer cell cultures such as organoids offer more clinically significant information regarding tumor characteristics, cell interactions and drug discovery. Furthermore, they have the potential to be a faster and more cost-effective alternative to PDX models [4].

So far, there are various organoid models from non-small cell lung cancer (NSCLC), but their effectiveness in selecting and evaluating chemotherapy for NSCLC still requires further evaluation. A major challenge with these models is the long period of time needed for their formation and growth, which typically takes 1 to 2 months as shown in most of the previous studies such as the one cited in reference [5]. This prolonged cultivation results in changes in the cellular composition of the organoids impacting their resistance to chemotherapeutic drugs [6].

For organoid generation, we used a new scaffold-based technology developed in our laboratory, which significantly reduces the growth period of tumor organoid formation up to two weeks with almost 100% probability. The size of the obtained organoids is larger, reaching up to 200 μm , which enables better histology evaluations. Additionally, this method allows development of a single organoid per well, making the drug screening results more meaningful and accurate.

Up to this point, our investigation has focused on studying the morphological structure of organoids derived from non-small cell lung cancer (NSCLC) tumors. We assessed the extracellular matrix composition surrounding tumor tissue and 7-day-old organoids using immunohistochemistry (IHC). Additionally, we optimized the protocols for assessing their resistance profiles to five specific anti-cancer drugs (Cisplatin, Gemcitabine, Pemetrexed, Etoposide, and Paclitaxel). To support the results of the previous experiments, we assessed the expression of genes encoding cytokines and growth factors that potentially participate in cancer cell growth and chemotherapeutic resistance.

In conclusion, our results revealed several key findings. Firstly, the method for generating non-small lung cancer organoids from tumor cells was successful, taking less than one week to obtain the organoids. Secondly, the organoids preserved their parental tumors' ability to deposit ECM proteins and form alveoli-like structures in the vicinity and between cells, similar to their parental tumors. Finally, organoids derived from different patients exhibited notable variations in drug resistance, which can be attributed, at least in part, to the cellular composition of tumors. Notably, our findings also demonstrate that the morphological and cytokine profiles of tumors can provide valuable insights into their drug resistance properties. Overall, our results indicate that organoids serve as a valuable representation of primary NSCLC tumors, mimicking their cellular composition, morphology, and gene expression patterns.

References

1. Duma N., Santana-Davila R., Molina J. R. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. // *Mayo Clinic Proceedings*. 2019. V. 94. P. 1623.
2. Rozenberg J. M., Filkov G. I., Trofimenko A. v., Karpulevich E. A., Parshin V. D., Royuk V. v., Sekacheva M. I., Durymanov M. O. Biomedical Applications of Non-Small Cell Lung Cancer Spheroids. // *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A. 2021. V. 11. P. 5,9.
3. Verduin M., Hoeben A., de Ruyscher D., Vooijs M. Patient-Derived Cancer Organoids as Predictors of Treatment Response. // *Frontiers in Oncology*. 2021. V. 11. P. 1,2.
4. Rae C., Amato F., Braconi C. Patient-derived organoids as a model for cancer drug discovery. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22. P. 2.
5. Yan Y., Arzua T., Logan S., Bai X. Isolation and Culture of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cerebral Organoid Cells. // *Methods in Molecular Biology*. 2022. V. 2454.
6. Zhao Z., Chen X., Dowbaj A. M., Slijkic A., Bratlie K., Lin L., Fong E. L. S., Balachander G. M., Chen Z., Soragni A., Huch M., Zeng Y. A., Wang Q., Yu H. Organoids. *Nature Reviews Methods Primers*. 2022. V. 2. P. 9.

УДК 576.53

Разработка метода получения 3D моделей кожи путем совместного культивирования фибробластов и кератиноцитов

**А.Ю. Полянская¹, А.С. Богданова^{1,2}, М.В. Волкова¹, В.В. Бояринцев¹, А.В. Трофименко¹,
Г.И. Фильков¹, Д.В. Багров^{2,3}, Д.В. Клинов^{1,2}, М.О. Дурыманов^{1,3}**

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),

²НИИ физико-химической медицины ФМБА

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Разработка новых методик по созданию 3D моделей кожи является актуальной задачей для регенеративной медицины. Эквиваленты кожи, полученные путем совместного культивирования фибробластов и кератиноцитов применяются в терапии хронических ран, при лечении ран от ожогов [1, 2]. Также 3D модели могут быть использованы для тестирования лекарственных препаратов, изучения механизмов биологических процессов в коже [3].

Целью данной работы является разработка метода получения эквивалентов кожи на матриксе из биоразлагаемых полимеров и оценка их приживаемости и ранозаживляющего действия на модели механической раны у мышей.

Для получения 3D моделей использовали первичные фибробласты и кератиноциты человека, а также клетки, которые были выделены из кожи новорожденных мышей и крыс возрастом 1 день. Таким образом, была показана возможность применения разработанного метода для клеток различных млекопитающих.

Результаты иммуногистохимии образцов 3D моделей, которые были получены на 5-й и 10-й день культивирования на границе среда/воздух свидетельствуют о наличии в эквивалентах кожи маркеров, характерных для фибробластов (виментин), базальных кератиноцитов (цитокератин 5), кератиноцитов на начальных стадиях дифференцировки (цитокератин 10), а также терминально дифференцированных клеток эпидермиса (лорикрин).

Использование раневых покрытий ускоряет процесс закрытия и ре-эпителизации полнослойных механических ран на мышинной модели по сравнению с группой, где раны не были покрыты трансплантантом. Приживление дермальной части раневых покрытий наблюдалось более чем в 90 % случаев, эпидермальная часть приживалась в 17 % случаев.

Литература

1. Roshangar L, Soleimani Rad J, Kheirjou R, Reza Ranjkesh M, Ferdowsi Khosroshahi A. Skin Burns: Review of Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. //Wounds. 2019. V. 31. P. 308-315
2. Vivcharenko V, Wojcik M, Przekora A. Cellular Response to Vitamin C Enriched Chitosan/Agarose Film with Potential Application as Artificial Skin Substitute for Chronic Wound Treatment.// Cells. 2020. V. 9(5), P. 1185
3. Niehues H, Bouwstra J.A, El Ghalbzouri A, Brandner J., Zeeuwen P., van den Bogaard E. 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. // Exp Dermatol. 2018. V. 27(5). P. 501-511.

УДК 579.61

The Role of TolC-containing MDR Pumps in Pumping out the main Antibiotics **Md Abdul Bari**

Moscow Institute of Physics & Technology

Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University

The *E. coli* AcrAB-TolC MDR efflux pump complex consists of AcrB, which represents Inner membrane protein (IMP) and recognizes substrates and utilizes the proton motive force (pmf) for substrate translocation. TolC, which represents the outer membrane protein (OMP) channel and facilitates the expulsion of substrates from the cell. AcrA, which represents a periplasmic adapter protein (PAP) and links AcrB and TolC and acts to safeguard the transport of the captured substrate across the periplasm. Each subunit of the transporter is an integral part of the efflux machinery [1]. MDR pumps are involved in resistance to antibiotics with any mechanism of action and protect bacteria even against those antibiotics for which they do not have specific resistance mechanisms [2].

The resistance of bacteria in the biofilms (in form of MIC) can exceed the resistance of planktonic forms by two orders of magnitude. The formation of biofilms includes several stages: (1) reversible attachment of planktonic cells to the surface, (2) cell proliferation and formation of microcolonies, (3) transformation of colonies into clusters of multilayer cell formations synthesizing extracellular polymeric substances (EPS), which form a matrix, (4) maturation of the biofilm with the transition of some cells to the planktonic form for the formation of new colonies [2].

MIC Determination

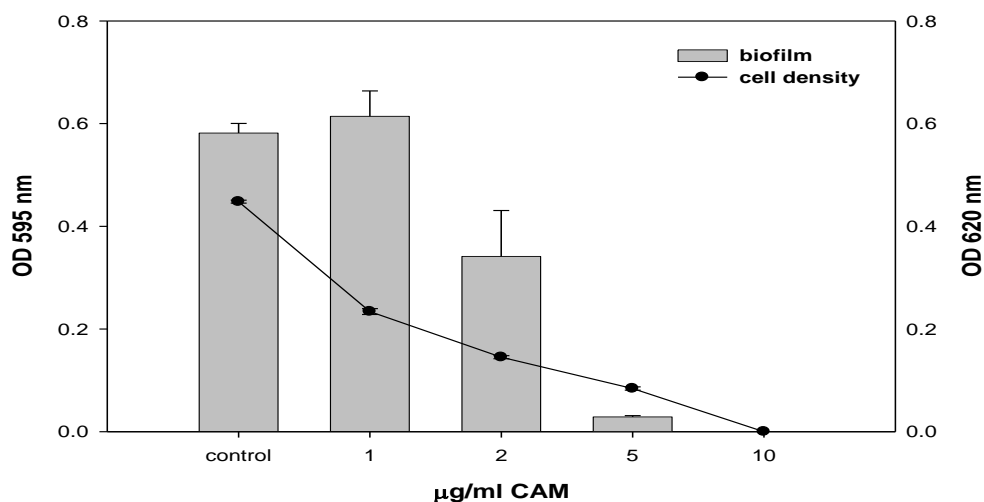
The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for chloramphenicol (CAM), Berberine (Ber), Beberine-C6 derivative were determined by using 2-fold broth microdilution method. The compounds were diluted in a 96-well microtiter plate to final concentrations ranging from 0.4 to 400 μM in a 200- μL aliquot of the bacterial suspension, followed by incubation at 37°C for 18 h. The following strains of bacteria were used: Escherichia coli K-12 MG1655. The MIC were determined as the lowest concentration that completely inhibited bacterial growth. The bacterial growth was observed visually alongside OD measurements [3]. The experiments is still going on to take more antibiotics.

Table: Suppression of the growth of E. coli K-12 MG1655 and its deletion mutants of the value of MIC

Mutants	CAM (1 mg/ml)	Ber (10mM)	Ber-C6 (10mM)	Ber-C9	CAM-C9-Ber
TolC	1.2 μM	128 μM	25 μM		
AcrB	1.5 μM	179 μM	76 μM		
AcrD	3.0 μM	384 μM			
AcrF	3.0 μM	384 μM			
MacB	3.0 μM	384 μM			
MdtB	3.0 μM	384 μM			
MdtE	3.0 μM	384 μM			
EmrB	4.6 μM	384 μM			
EmrY	4.6 μM	384 μM			
Wild type (WT)	6.1 μM	384 μM			

Biofilm Development

To assess how compounds affect biofilm formation, modified the protocol [4] and evaluated the effects of a substance on biofilm formation as a change in the ratio of planktonic and sessile forms of bacteria. The microbial biofilms were cultivated in LB media in polystyrene 96-well plates (Citotest, Haimen, China). Panels of test substances were prepared by the method of double dilutions, 200 μL of which was added to each well. Antibiotics were not added to control samples. E. coli K-12 MG1655 cell suspension (5×10^5 cells per mL) was added to each well. Microtiter plates were incubated at 37°C in a Thermo Scientific Multiskan FC plate reader with an incubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 20 h. Bacterial growth was observed by means of OD₆₂₀ measurements each hour [5]. After incubation, the liquid media was discarded by inverting the plate upside down to dump the cell suspension, and the plate was triply washed with PBS buffer to remove loose cells. To fix the remaining biofilms, the plates were placed in a thermostat at 60°C for 30 min. To stain biofilms, 40 μL of 1% crystal violet was added to each well and left to stain for 30–60 min. The crystal violet was discarded, and the plate was washed twice with DI water, and then 200 mL of 95% ethanol was added into each well to extract the crystal violet. Measurement of the absorbance of crystal violet was performed at 595 nm using the microplate reader. This work is also going on.



Funding: This work is supported by grants from the Russian Science Foundation (RSF) and the Russian Foundation for Basic Research (RFBR).

References

1. Rawaf A. Drug Efflux Pump Inhibitors: A Promising Approach to Counter Multidrug Resistance in Gram-Negative Pathogens by Targeting AcrB Protein from AcrAB-TolC Multidrug Efflux Pump from *Escherichia coli* *Biology* 2022, 11(9), 1328; <https://doi.org/10.3390/biology11091328>
2. Nazarov P.A. MDR Pumps as Crossroads of Resistance: Antibiotics and Bacteriophages. *Antibiotics* 2022, 11, 734. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060734>
3. Pavlova J.A., Tereshchenkov A.G., Nazarov P.A. Lukianov D.A. Skvortsov D.A. Polshakov V.I. Vasilieva B.F. Efremenkova O.V., Kaiumov M.Y., Paleskava A., et al. Conjugates of Chloramphenicol Amine and Berberine as Antimicrobial Agents. *Antibiotics* 2023, 12, 15; <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010015>
4. Feng X.-C., Guo W.-Q., Zheng H.-S., Wu Q.-L., Luo H.-C., Ren N.-Q. Effect of Metabolic Uncoupler, 3, 30, 40, 5-Tetrachlorosalicylanilide (TCS) on *Bacillus Subtilis*: Biofilm Formation, Flocculability and Surface Characteristics. *RSC Adv.* 2018, 8, 16178–16186; <https://doi.org/10.1039/c8ra02315h>
5. Nazarov P.A., Osterman I.A., Tokarchuk A.V., Karakozova M.V., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Skulachev M.V., Kotova E.A., Skulachev V.P., Antonenko Y.N. Mitochondria-Targeted Antioxidants as Highly Effective Antibiotics. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1394; <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00802-8>.

УДК 579.017.7

Управление метаболизмом бактерий – новый подход к терапии резистентных инфекций

Ю.А. Папа-Дмитриева¹, Т.А. Серегина²

¹ Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Борьба с возникновением и распространением бактериальных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью, провоцирующих развитие внутрибольничных инфекций, остается актуальной задачей здравоохранения во всем мире. За последние годы появилось много данных о том, что метаболический статус бактериальной клетки определяет ее восприимчивость к различным антибактериальным препаратам, независимо от механизма их действия [1]. Клетки в стадии активного деления и роста являются более уязвимыми для воздействия антибиотиков. Ключевыми метаболитами, определяющими скорость роста бактериальной культуры, являются пентозофосфаты, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот, АТФ, восстановительных эквивалентов. Образование пентоз происходит в пентозофосфатном пути (ПФП), важным свойством которого является возможность генерации большого количества восстановительных эквивалентов NADPH с возвратом избытка пентоз в гликолиз [2]. Настоящая работа посвящена изучению влияния инактивации генов изомераз *rpiA* и *rpiB* и эпимеразы *rpe*, участвующих во взаимном превращении пентозофосфатов, на чувствительность клеток *E. coli* к антибиотикам. В ходе исследования было обнаружено, что инактивация генов изомераз *rpiA* и *rpiB* приводит к резкому повышению чувствительности клеток *E. coli* к различным антибиотикам, в то время как клетки с делецией гена *rpe* незначительно отличаются от клеток дикого типа (рис. 1). Определение количества восстановленных эквивалентов в исследуемых мутантах показало значительное снижение уровня NADPH в мутанте $\Delta rpiAB$ (рис. 2a). Одним из неспецифических действий антибиотиков является положительная индукция окислительного стресса [3], поэтому поддержание достаточного пула восстановителей является необходимым условием для формирования адекватного ответа на стресс. Эквиваленты NADPH учувствуют в восстановлении другого важного протектора против окислительного стресса - глутатиона. Согласно полученным результатам, в мутанте $\Delta rpiAB$ наблюдается значительное снижение общего пула глутатиона. Кроме того, соотношение между восстановленной и окисленной формой глутатиона сдвинуто в сторону последнего (рис. 2b). Таким образом, мы наблюдаем в мутанте по генам изомераз $\Delta rpiAB$ значительный дефицит восстановителей, что свидетельствует о возникновении редокс-дисбаланса, обуславливающего, по всей видимости, повышение чувствительности к антибиотикам.

Делеция генов изомераз *rpiAB* приводит к необходимости синтезировать рибозу 5-фосфат через обращение неокислительной ветви ПФП, что может провоцировать возникновение избытка пентозофосфатов. Интересно, что добавление в ростовую среду рибозы значительно подавляет рост мутанта *rpiAB*, тогда как ксилоза не оказывает такого эффекта (рис. 2c). Нуклеозиды, как потенциальные источники рибозы 5-фосфата, также ингибируют рост штамма $\Delta rpiAB$. Полученные данные свидетельствуют о том, что инактивация изомераз в клетках *E. coli* нарушает взаимосвязь между поддержанием пула пентозофосфатов и генерацией

восстановителей (NADPH и глутатиона), что сопровождается возникновением сверхчувствительности к антибиотикам.

Настоящая работа была поддержана грантом РФФ 17-74-30030.

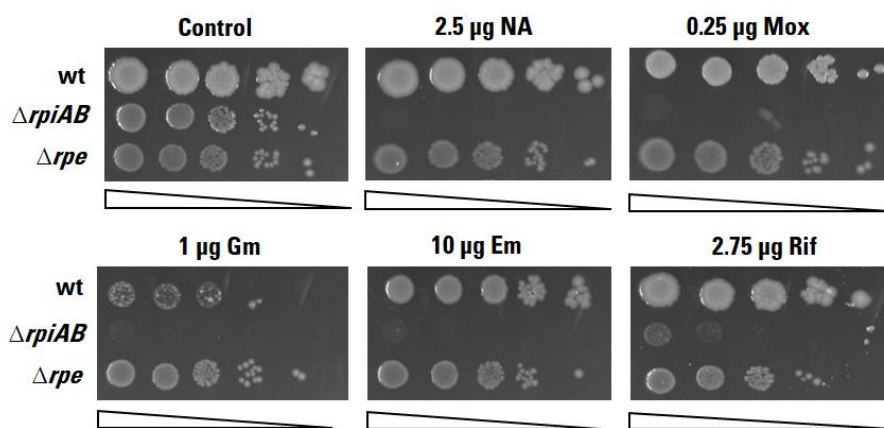


Рисунок 1. Чувствительность штаммов *E. coli* с с инактивированными генами *rpiAB* и *rpe* к различным группам антибиотиков: хинолоны (налиндиксовая кислота (NA), моксифлоксацин (Mox)), аминогликозиды (гентамицин (Gm)), макролидам (эритромицин (Em)), ингибиторы РНК-полимеразы (рифампицин (Rif)).

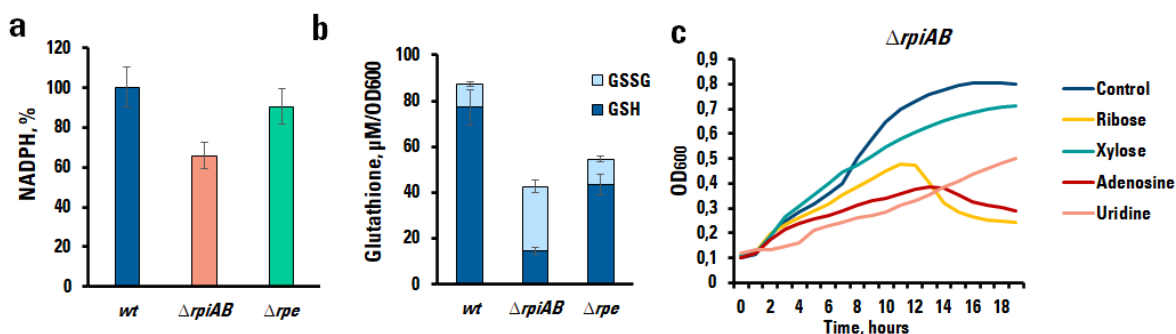


Рисунок 2. Фенотипическая характеристика мутантов $\Delta rpiAB$ и *rpe*. а) Уровень восстановленных эквивалентов NADPH. б) Соотношение окисленного и восстановленного глутатиона. в) Влияние пентоз и нуклеозидов на рост мутантов *rpiAB*.

Литература

1. Stokes J.M., Lopatkin A.J., Lobritz M.A., Collins J.J. Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy. *Cell Metabolism* 2019, 30, 251-259, doi:10.1016/j.cmet.2019.06.009.
2. Krüger A., Grüning N.-M., Wamelink M.M.C., Kerick M., Kirpy A., Parkhomchuk D., Bluemlein K., Schweiger M.-R., Soldatov A., Lehrach H., et al. The Pentose Phosphate Pathway Is a Metabolic Redox Sensor and Regulates Transcription During the Antioxidant Response. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011, 15, 311–324, doi:10.1089/ars.2010.3797.
3. Dwyer D.J., Kohanski M.A., Collins J.J. Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic Action and Resistance. *Current Opinion in Microbiology* 2009, 12, 482-489, doi:10.1016/j.mib.2009.06.018.

УДК 577.29

Абортивные системы противовирусной защиты профага P2 - Old нуклеаза является сенсором целостности RecBCD комплекса

А.А. Держаев¹, К.В. Северинов³, А.Б. Исаев²

¹Московский физико-технический институт

²Сколковский институт науки и технологий

³Институт микробиологии Ваксмана, Пискаревский

За последние годы было выявлено огромное разнообразие бактериальных систем защиты от вирусных инфекций и показано, что абортивный иммунитет является крайне распространенным способом защиты от фагов. Абортивные системы приводят к гибели зараженной клетки, но при этом не высвобождается фаговое потомство и инфекция замедляется на уровне популяции. Что интересно, умеренные фаги также могут кодировать системы абортивного иммунитета и находясь в состоянии

профага могут защищать своих хозяев от инфекции другими фагами. Бактериофаг P2 кодирует сразу 3 системы защиты с предполагаемым abortивным механизмом: Old, FunZ и Tin, которые совместно предоставляют клеткам, лизогенизированным P2, практически полную защиту от широкого спектра фагов. Old защищает от λ и многих сифовирусов, FunZ от T5-подобных фагов, в то время как Tin дает защиту от T-четных фагов. Для того чтобы выяснить механизмы abortивного ответа данных белков, а также установить принципы их активации, мы заклонировали Old, FunZ и Tin и проверили спектр их защиты против нашей коллекции фагов. В большинстве случаев, спектры защиты этих систем не перекрываются, но в то же время лизоген P2 обладал намного более высоким уровнем защиты от конкретных фагов, по сравнению со штаммом, несущим лишь отдельные иммунные белки, что предполагает кумулятивный защитный эффект.

Наиболее интересным представлялось установить механизмы активации системы Old. Ранее было известно, что Old отвечает за защиту от λ [1], а также является крайне токсичным в клетках с делециями RecBC [2]. Old включает 2 домена: SMC с АТФазной активностью и TOPRIM обладающий *in vitro* нуклеазной активностью [3]. При этом, доменная организация Old крайне похожа на недавно открытую систему abortивного иммунитета PARIS, которая активируется при обнаружении вирусных анти-рестрикторных белков. Для SMC домена PARIS/Old можно предложить роль сенсора, а для TOPRIM нуклеазы - эффектора, однако, принципы активации этих систем различаются. Мы показали, что каждая из делеций RecB/RecC/RecD, но не RecA, приводит к смерти клеток, в которых экспрессируется Old. Из этого можно предположить, что Old является сенсором целостности комплекса RecBCD, но при этом не влияет на его репаративную/рекомбинационную функции. Изучая функционально дефицитные мутанты RecBCD, мы обнаружили, что мутации нуклеазы RecB, Chi-распознающего мотива RecC и АТФазы/хеликазы RecD не являются триггерами Old, в то время как мутация АТФазы/хеликазы субъединицы RecB приводит к гибели клеток. Поскольку многие фаги манипулируют активностью RecBCD в ходе инфекции, это может привести к запуску abortивного ответа Old. Чтобы проверить эту гипотезу мы заклонировали ингибиторы RecBCD - белки Gam фага λ и 5.9 фага T7. В то время как экспрессия этих белков в контрольной культуре не была токсична, в присутствии Old она приводила к гибели клеток. Более того, фаг λ с мутациями в гене, кодирующем Gam был способен эффективно инфицировать Old культуру.

Поскольку в нашей коллекции обнаружилось большое количество фагов чувствительных к Old, но не кодирующих гомологов Gam, 5.9 или Abc белков (RecBCD ингибитор фага P22), это предполагает возможность открытия новых классов вирусных анти-RecBCD белков. Помимо этого, некоторые фаги, явно манипулирующие активностью RecBCD не активировали Old защиту, что в свою очередь предполагает наличие у них уже специальных механизмов, позволяющих избежать активации Old.

Работа поддержана грантом РНФ (22-14-00004) а также грантом Министерства Науки и Образования Российской Федерации (075-10-2021-114).

Литература

1. Lindahl G., Sironi G., Bialy H., Calendar R. Bacteriophage lambda; abortive infection of bacteria lysogenic for phage P2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1970 Jul;66(3):587-94. doi: 10.1073/pnas.66.3.587. PMID: 4913204; PMCID: PMC283090.
2. Sironi G. Mutants of Escherichia coli unable to be lysogenized by the temperate bacteriophage P2. Virology. 1969 Feb;37(2):163-76. doi: 10.1016/0042-6822(69)90196-2. PMID: 4884707.
3. Schiltz C.J., Adams M.C., Chappie J.S. The full-length structure of Thermus scotoductus OLD defines the ATP hydrolysis properties and catalytic mechanism of Class 1 OLD family nucleases. Nucleic Acids Res. 2020 Mar 18;48(5):2762-2776. doi: 10.1093/nar/gkaa059. PMID: 32009148; PMCID: PMC7049728.

УДК 577.352.45

Митохондриальная экспрессия родопсинов: сравнение эффективности сигнальных последовательностей

Д. Е. Кравцунова, С.М. Бухалович, Д.Ф. Багаева, А.Д. Власова, А.И. Куклин

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Митохондрии играют важную роль в обеспечении энергией и метаболизме эукариотических клеток. Дисфункция митохондрий связана со многими патологическими состояниями и заболеваниями. Нормальное функционирование митохондрий зависит от потенциала внутренней митохондриальной мембраны (обеспечивает синтез АТФ), окислительно-восстановительного баланса и обеспечивает регуляцию ключевых сигнальных путей, таких как митофагия и апоптоз.

Оптогенетика с использованием родопсинов - метод управления потенциалом с помощью света, как правило, на плазматической мембране возбудимых клеток. С открытием новых сигнальных последовательностей появилась возможность перейти к субклеточным органеллам. Ранее были успешно экспрессированы канальный родопсин 2 (ChR2 из *Chlamydomonas reinhardtii*) и его мутанты, а также прямые протонные помпы (MAC, dR [3]) во внутренней мембране митохондрий (ИММ) для управления мембранным потенциалом. Экспрессия канального родопсина 2, например, дало возможность контролировать деполяризацию ИММ с помощью света, что может индуцировать митофагию и апоптоз [1]. Так же снижение потенциала было способно уменьшать накопление Ca^{2+} и останавливать спонтанное сокращение кардиомиоцитов [2].

В данной работе была проверена способность трех сигнальных последовательностей обеспечивать экспрессию других родопсинов в ИММ, чтобы расширить набор инструментов митохондриальной оптогенетики. ChR2 экспрессировался в митохондриях с сигнальными последовательностями 4-х tandemных повторов MTS от CoxVIII (ChR2 был укорочен на 24 а.о. на его N-конце) и первых 140 а.о. белка ABCB10 (ИММ-белок семейства ABC-связывающих кассет). MAC был слит на N-конце с первыми 187 аминокислотными остатками ИММ-белка митофилина, что согласуется с литературными данными. Также были впервые экспрессированы в ИММ пять новых родопсинов: вирусный родопсин (VirChR1), прямая протонная помпа Arch3 из *Halorubrum sodomense* и обратные протонные помпы-ксенородопсины NsXeR из *Nanosalina sp.*, BcXeR из *Bacillus coahuilensis* и PoXeR из *Parvularcula oceani*.

Из полученных данных можно сделать вывод, что сигнал из белка митофилина приводит к наиболее эффективной локализации большинства родопсинов в митохондриях клеток НЕК293Т.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 21-64-00018.

Литература

1. Ernst P. et al. Precisely Control Mitochondria with Light to Manipulate Cell Fate Decision // Biophysical Journal 117. August 20, 2019, 2017, 631–645.
2. Tkatch T. et al. Optogenetic control of mitochondrial metabolism and Ca^{2+} signaling by mitochondria-targeted opsins // PNAS. Published online June 13, 2017, E5167–E5176.
3. Imai Y., Inoshita T., Meng H., Shiba-Fukushima K., Hara K. Y., Sawamura N., Hattori N. Light-driven activation of mitochondrial proton-motive force improves motor behaviors in a Drosophila model of Parkinson's disease // Communications Biology. 2019. 2(1). pp. 1–11. doi: 10.1038/s42003-019-0674-1.

УДК 579

Изучение иммуномодулирующих свойств штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21: потенциал использования в медицине

Е.В. Гришина^{1,2}, А.А. Ватлин²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Изучение иммуномодулирующих свойств отдельных штаммов микробиоты кишечного тракта человека является важным направлением исследований в мировой науке последнего десятилетия. Лактобактерии, являющиеся наиболее распространенными обитателями желудочно-кишечного тракта человека, активно синтезируют различные биологически активных соединения, которые могут влиять на иммунный статус и антиоксидантный (АО) статус хозяина, что делает микробиом кишечника естественным источником фармабиотиков для профилактики и лечения заболеваний различной этиологии, в первую очередь характеризующихся нарушением функционирования иммунной системы. Фармабиотики - живые штаммы комменсальных бактерий кишечника человека, их компоненты (клеточные стенки, полисахариды) и ингредиенты (белки, пептиды, ферменты, специфические фрагменты ДНК, малые РНК) и другие биологически активные вещества, проявляющие фармакологическую активность и безопасные в использовании [5]. В данной работе проанализирована иммуномодулирующая активность штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21 (Патент RU2705250), выделенного из организма взрослого здорового человека, жителя центрально-европейской части Российской Федерации, являющийся потенциальным фармабиотиком, синтезирующий ряд биологически активных веществ, обладающих иммуномодулирующей активностью. Штамм *L. fermentum* U-21 отобран за уникальные антиоксидантные свойства [1]. Антиоксидантная активность штамма был подтверждена на различных *in vivo* и *in vitro* моделях. В частности, *L. fermentum* U-21 увеличил продолжительность жизни нематоды *C. elegans* на 25 % в условиях окислительного стресса, вызванного паракватом [2]. В модели индуцированного паркинсонизма у грызунов, *L. fermentum* U-21 предотвращал дегенерацию дофаминергических нейронов головного мозга и патологические изменения внутренних органов [2]. По результатам геномного анализа штамма *L. fermentum* U-21 было идентифицировано 29 генов, связанных с антиоксидантным потенциалом, наиболее важными из которых

являются гены тиоредоксинового комплекса и метаболизма, и транспорта тяжелых металлов [3]. Для использования штамма в качестве фармабиотика требуется углубленное изучение различных его свойств, в том числе изучение его иммуномодулирующей активности, а именно биологически активные соединения, которые могут отвечать за иммуномодулирующую активность штамма и активировать иммунную систему человека. Целью этой работы было идентифицировать метаболиты с противовоспалительной активностью и биологически активные метаболиты, снижающие оксидативный стресс и его последствия, характерные для *L. fermentum* U-21 с помощью метода газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Поиск уникальных метаболитов штамма *L. fermentum* U-21 осуществлялся с целью идентифицировать секретируемые метаболиты из клетки в двух фракциях культуральная жидкость и везикулы (липидные бислоиные капсулы, отделяющиеся от мембран бактерий, содержащие различные белки, нуклеиновые кислоты, метаболиты), оказывающие положительное действие на организм хозяина. По результатам сравнительного метаболомного анализа культуральной жидкости и везикул штамма *L. fermentum* U-21 со штаммом *L. fermentum* 279, не проявляющем высоких АО свойств, было обнаружено всего 1144 метаболита *L. fermentum* U-21, и 365 в везикулах. Сравнивая метаболиты исследуемого штамма со штаммом *L. fermentum* 279, 317 метаболитов в культуральной жидкости и 82 в везикулах оказались уникальными для *L. fermentum* U-21. Кроме того, было определено, что *L. fermentum* U-21 продуцирует ГАМК, которая является аминокислотой и основным тормозным нейротрансмиттером в центральной нервной системе человека. Также штамм продуцирует нейротрансмиттеры, такие как адреналин, дофамин, норадреналин, глицин. L-ДОФА, который был обнаружен только у *L. fermentum* U-21, является предшественником нейротрансмиттеров дофамина, и используется в клиническом лечении болезни Паркинсона [6]. Метаболический анализ штамма также выявил наличие пироглутаминовой кислоты, орнитина, цистеина, глутаминовой кислоты, глицина, из которых синтезируется глутатион, являющийся главным антиоксидантом организма, что подтверждается наличием генов ответственных за синтез и транспорт глутатиона [3]. Среди метаболитов везикул *L. fermentum* U-21 обнаружены биологически значимые компоненты: 5- гидрокситриптофан, мелатонин, индол-3-ацетамид, адреналин, ГАМК, 2-кето-d-глюконовая кислота, норвалин, 5-метокситриптамиин, 3-фенилмолочная кислота, тимонадик. Таким образом, штамм *L. fermentum* U-21 и постбиотики полученные на его основе (внеклеточные метаболиты и везикулы) могут быть перспективными ингредиентами при создании фармпрепаратов и лечебных продуктов питания.

Литература

1. Marsova M., Abilev S., Poluektova E., Danilenko V. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of lactobacillus strains from human microbiota//World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2018. – 34. – p. 1-9.
2. Marsova M., Poluektova E., Odorskaya M., Ambaryan A., Revishchin A., Pavlova G., Danilenko V. Protective effects of Lactobacillus fermentum U-21 against paraquat-induced oxidative stress in Caenorhabditis elegans and mouse models. //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2020. – 36. – p. 1-10.
3. Poluektova E., Mavletova D., Odorskaya M., Marsova M., Klimina K., Koshenko T., Yunes R., Danilenko V. Comparative Genomic, Transcriptomic, and Proteomic Analysis of the Limosilactobacillus fermentum U-21 Strain Promising for the Creation of a Pharmabiotic// Russian Journal of Genetics. – 2022. – 58. – p. 1079-1090.
4. Poluektova E., Yunes R., Danilenko V. The putative antidepressant mechanisms of probiotic bacteria: relevant genes and proteins// Nutrients. – 2021. – 13. – p. 1591.
5. Lee E.S. et al. Probiotics in human health and disease: from nutraceuticals to pharmabiotics //Journal of Microbiology. – 2018. – T. 56. – C. 773-782.
6. Le Witt P.A. Levodopa therapy for Parkinson's disease: pharmacokinetics and pharmacodynamics //Movement Disorders. – 2015. – T. 30. – №. 1. – C. 64-72.

УДК 57.577.29

Влияние гипертермии на экспрессию генов, регулирующих свойства стволовых клеток и ЭМТ, на примере рака молочной железы линий MCF-7 и MDA-MB-231

М.К. Попова¹, А.О. Якимова²

¹Обнинский институт атомной энергетики – филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

²Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба - филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

К числу самых распространённых онкологических заболеваний относится рак молочной железы (РМЖ). В настоящее время идёт активный поиск лечения с возможностью минимизации побочных эффектов для организма. Среди них приоритетным считается комбинированное действие лучевой терапии,

химиотерапии и гипертермии [1]. Гипертермия обладает протеотоксическим действием на клетки и активирует в них специфический стресс-ответ – «Heat Shock Response». В результате, на определенный период времени после прогрева клетка становится крайне уязвимой к различным повреждающим воздействиям, поскольку многие молекулярные системы (включая необходимые для репарации ДНК) выведены из строя, а для синтеза новых белков и/или восстановления функций денатурировавших, требуется время.

В настоящий момент выделяют различные молекулярные подтипы РМЖ, среди которых наиболее распространены люминальный тип А, люминальный тип В и трижды негативный РМЖ. Подтипы отличаются друг от друга по экспрессии следующих рецепторов: эстрогену, прогестерону и эпидермальному фактору роста [2, 3]. Материалом для исследования экспрессии генов служили клеточные линии MCF-7 (модель РМЖ люминального типа А) и MDA-MB-231, относящаяся к трижды негативному РМЖ. Клетки принципиально отличаются друг от друга соотношением стволовых клеток, что делает их привлекательным объектом для изучения изменения экспрессии генов, регулирующих свойства стволовых клеток и эпителиально-мезенхимальную транзицию (ЭМТ) под действием гипертермии.

Клетки культивировали на ростовой среде DMEM, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США), пенициллин (50 ед/мл) и стрептомицин (50 мкг/мл), в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂, влажность 100%). В исследование были взяты следующие группы клеток: контрольные (культивированные без гипертермии), прогретые в водяной бане в течение 1 часа при температуре 43°C (сбор образцов проводили сразу после прогрева и спустя 24 часа после процедуры). Уровень экспрессии генов определяли методом полимеразно-цепной реакции в реальном времени. Выделение тотальной РНК проводили с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Для получения кДНК использовали обратную транскриптазу MMLV (Евроген, Россия), в качестве матрицы брали по 1 мкг РНК на каждую реакцию. Праймеры, используемые в работе, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Праймеры к генам, регулирующих свойства стволовых клеток и ЭМТ.

Ген	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')
H	GAPD	ССТСТGACTTCAACAGCGACA
		TTG GTTGTCATACCAGGAAATGAGC
C	IPO8	GCAGAGTGTTCATGCAGCTAAA
		A GACCCCTCGAGTTAATCTCTCC
	OCT4	AGGAGAAGCTGGAGCAAACC
	SNAIL	AGCGAGCTGCAGGACTCTAA
C	SLUG	ACAGCGAACTGGACACACATA
		CAGTGATGGGGCTGTATGCTC
G	NANO	GATGCCTCACACGGAGACTG
		T GCAGAAGTGGGTTGTTTGCC
	VIM	GAGATGCTTCAGAGAGAGGAA
	ZEB1	ACCTGCCAACAGACCAGACA
		T CTTGCAAAGATTCCACTTTGCG
		GAGCTTCAGGCCCCAGGATT

Каждый эксперимент повторяли в трёх повторностях. Анализ изменения экспрессии генов проводили по методу $\Delta\Delta C_t$ [4]. В качестве референса использовали гены GAPDH и IPO8, имеющие относительно устойчивый уровень экспрессии в данных экспериментальных условиях согласно результатам проверки, при помощи сервиса RefFinder [5]. Статистическую обработку проводили в программе Statistica с использованием U-критерия Манна-Уитни.

В ходе работы было установлено, что гипертермия оказывает влияние на экспрессию ряда генов, регулирующих свойства стволовых клеток и ЭМТ, однако наблюдаемые эффекты отличаются у клеток сравниваемых линий. Наиболее яркие результаты получены для гена *SNAIL* (рис.1), играющего важную роль в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). ЭМП играет важную роль в прогрессии опухолей в сторону более злокачественной формы [6].

Согласно полученным данным, сразу после прогрева уровень экспрессии гена *SNAIL* статически значимо ($p=0.029$) увеличился в обеих клеточных линиях: в MCF-7 составил $4,22\pm 0,16$, для MDA-MB-231 – $4,23\pm 1,12$. При этом, спустя 24 часа после прогрева в клетках MDA-MB-231 наблюдается ещё более выраженное повышение уровня экспрессии *SNAIL* ($18,29\pm 1,04$) по сравнению с контролем, в то время как в клетках линии MCF-7 уровень экспрессии *SNAIL* ($0,44\pm 0,05$) снижается относительно такового в контроле. Помимо *SNAIL*, через 24 часа после действия гипертермии происходит статически значимое ($p=0,029$) некоторое повышение экспрессии гена *NANOG* ($1,63\pm 0,07$ для MCF-7, $1,46\pm 0,12$ для MDA-MB-231) и существенное статически значимое ($p=0,029$) снижение экспрессии гена *ZEB1* ($0,15\pm 0,004$ для MCF-7, $0,75\pm 0,02$ для MDA-MB-231).

Полученные данные позволяют предполагать, что гипертермия может способствовать активации процесса ЭМТ в клетках РМЖ, что может способствовать увеличению пула опухолевых стволовых клеток в популяции, поскольку эти процессы тесно взаимосвязаны [6]. Следует отметить, что клетки линий MCF-7 и MDA-MB-231, являющиеся моделями РМЖ различных молекулярных подтипов, по-разному реагируют на гипертермию на уровне экспрессии исследуемых генов. Это позволяет предполагать, что и конечные эффекты гипертермии (на уровне изменения свойств опухолевых клеток) могут отличаться. Ответ на этот вопрос требует проведения дополнительных исследований.

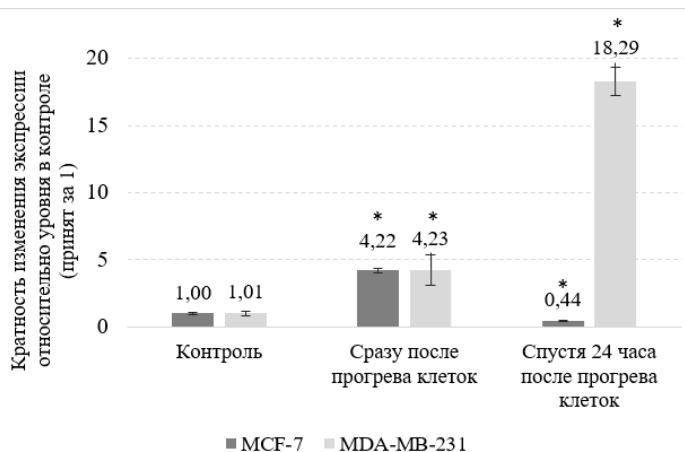


Рисунок 1. Изменение уровня экспрессии гена SNAIL в клеточных линиях MCF-7 и MDA-MB в ответ на гипертермию. Статистически значимые ($p=0.029$) отличия отмечены звездочками (*).

Литература

1. Datta N.R., Ordóñez S.G., Gaip U.S., Paulides M.M., Crezee H., Gellermann J., Marder D., Puric E., Bodis S. Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: recent advances and promises for the future // *Cancer Treat Rev.* – № 9, v.41. – p. 742-753.
2. Кулигина Е.Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы // *Практическая онкология.* – 2010. – Т. 11. – №. 4. – с. 203-216.
3. Łukasiewicz S., Czezelewski M., Forma A., Baj J., Sitarz R., Stanisławek A. Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—an updated review // *Cancers.* – 2021. – № 17, v. 13. – p. 4287.
4. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method // *Nature protocols.* – 2008. – № 6, v.3. – p. 1101-1108.
5. RefFinder URL: <http://bloomer.cn/RefFinder/> (дата обращения: 13.02.2023).
6. Мнихович М.В. Морфологические и ультраструктурные особенности эпителиально-мезенхимальной трансформации при раке молочной железы // *Вестник Авиценны.* – 2013. – №. 2 (55). – с. 39-45.

УДК 575.22

Поиск регуляторных элементов ДНК, необходимых для р53-зависимой активации гена *Xrp1*

у *Drosophila melanogaster*

С.З. Нуралиева^{1,2,3}, Д.Д. Пантелеев¹, А.В. Конопатов¹, К.Ю. Конова¹, Л.А. Лебедева¹, Ю.В. Шидловский^{1,2}

¹Лаборатория регуляции экспрессии генов в развитии, Институт биологии гена РАН

²Кафедра биологии и общей генетики, Сеченовский Университет

³СНК по медицинской генетике, Кафедра медицинской генетики, Сеченовский Университет

С момента открытия и по сегодняшний день ведется активное изучение раковых клеток и опухолевых тканей, несущих мутации белка р53. В литературе описана как его супрессорная, так и онкогенная активность. Описаны различные мутации данного фактора, связанные с раковым перерождением клеток [1].

Механизмы работы и регуляции р53 у модельного организма *D. melanogaster* аналогичны тем, что имеются в организме человека. Транскрипционный фактор р53 связывается с определенными сайтами на ДНК (response elements, RE) и регулирует транскрипцию нижестоящих генов-мишеней. Так, например, у *D. melanogaster* в сайте 75C6 описаны проапоптогические гены-мишени для р53-зависимой активации апоптоза, в частности, *reaper* (*rpr*) [2, 3]. На 4.8 kb выше *rpr* находится р53-зависимый энхансер – р53RE, активирующий близлежащие гены. Кроме того, р53RE индуцирует ген *Xrp1*, находящийся более чем в 20 Mb от энхансера на другом плече хромосомы [4]. Вблизи р53RE и *Xrp1* находятся сайты связывания факторов, влияющих на архитектуру хроматина (CTCF и GAF). В данной работе осуществляется поиск последовательностей ДНК и

белковых факторов, отвечающих за дальнейшее взаимодействие р53-зависимого энхансера с генами-мишенями в геноме.

Мы применили метод CRISPR/Cas9 для получения линии мух с удаленным фрагментом длиной 7 kbp, который включает р53RE и последовательности связывания факторов CTCF и GAF. Далее, удаленный фрагмент был замещен мутантными конструкциями, лишенными определенных сайтов связывания. Для визуализации взаимодействия локусов *p53RE* и *Xrp1* в 3D в ответ на облучение и измерения расстояния между ними используются методы ДНК FISH и конфокальной микроскопии.

При измерении экспрессии проапоптотических генов до и после облучения в 40 Грей была показана активация проапоптотических генов в контрольных образцах. В образцах с делецией энхансера экспрессия р53-зависимых генов нарушена. При измерении расстояния между локусами *Xrp1* и р53RE в ядрах, было показано, что в контрольных образцах облучение вызывает сближение энхансера и промотора, однако, в линии с делецией энхансера и замены его на укороченные фрагменты сближения не происходит. Наконец, для определения сайтов гена *Xrp1*, необходимых для взаимодействия с р53-зависимым энхансером, различные фрагменты гена *Xrp1*, клонированы вместе с GFP-репортером. Эти конструкции используются для получения трансгенных линий.

В результате выполненной работы была показана значимость областей, расположенных вблизи изучаемого энхансера, в контроле их экспрессии. Область энхансера содержит последовательности, необходимые для формирования дальних взаимодействий в геноме при его активации.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда 20-14-00201.

Литература

1. Marques M.A. et al. "Protein of a thousand faces: The tumor-suppressive and oncogenic responses of p53." *Frontiers in molecular biosciences* vol. 9 944955. 25 Aug. 2022.
2. Brodsky M.H., Nordstrom W., Tsang G., Kwan E., Rubin G.M., Abrams J.M. Drosophila p53 Binds a Damage Response Element at the reaper Locus. *Cell*, (2000), 101(1), pp.103–113.
3. Brodsky M.H., Weinert B.T., Tsang G., Rong Y.S., McGinnis N.M., Golic K.G. Rio D.C. and Rubin G.M. (2004). Drosophila melanogaster MNK/Chk2 and p53 Regulate Multiple DNA Repair and Apoptotic Pathways following DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, 24(3), pp.1219–1231.
4. Link N., Kurtz P., O'Neal M., Garcia-Hughes G., Abrams J.M. A p53 enhancer region regulates target genes through chromatin conformations in cis and in trans. *Genes & Development*. (2013), 27(22), pp.2433–2438.

УДК 576.32/36

Виментин участвует в регуляции мембранного потенциала митохондрий в нейронах

Ван Хуэйин^{1,2}, А.А. Даял², А.А. Минин²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт Белка РАН

Мембранный потенциал митохондрий ($\Delta\Psi_m$) важен для многих процессов, в которые вовлечены митохондрии. Так, транспорт и остановка митохондрий в разных участках клеток ассоциированы с изменениями $\Delta\Psi_m$, который модулируется в зависимости от локальной активности клетки. $\Delta\Psi_m$ также играет ключевую роль в процессах деления и слияния митохондрий. Процессы слияния, деления, транспорта митохондрий особенно важны в нейронах, которым требуется много энергии для выполнения своих функций, в том числе генерации мембранного потенциала на плазматической мембране при передаче возбуждения.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что белки промежуточных филаментов (ПФ) играют важную роль в регуляции мембранного потенциала митохондрий [1]. В других лабораториях показали, что в аксонах промежуточных филаментов по крайней мере в 10 раз больше, чем других компонентов цитоскелета. Интересно, что избыточное накопление белков ПФ в нейронах и глиальных клетках приводит, либо является признаком многих нейродегенеративных заболеваний, включая боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона, болезнь Шарко – Мари – Тута, а также гигантской аксональной нейропатии [2]. Следовательно, ПФ играют важную роль в развитии и течении целого ряда нейродегенеративных заболеваний.

В представленной работе мы изучаем проблему неравномерного распределения митохондрий с разным мембранным потенциалом в нейронах. Мы также проверяем гипотезу, что белок семейства промежуточных филаментов виментин участвует в этом распределении.

Для этого мы используем культуру нейронов CAD (Catha.a дифференцированные) и такую же культуру с нокаутом виментина ($CAD^{-/-}$), созданную с помощью системы CRISPR-Cas9. Мы также применяем методы РНК-интерференции, флуоресцентной микроскопии и покраски клеток митохондриальным потенциал-чувствительным красителем (JC-1) для выявления роли виментина в регуляции мембранного потенциала митохондрий в нейронах (рис. 1, 2).

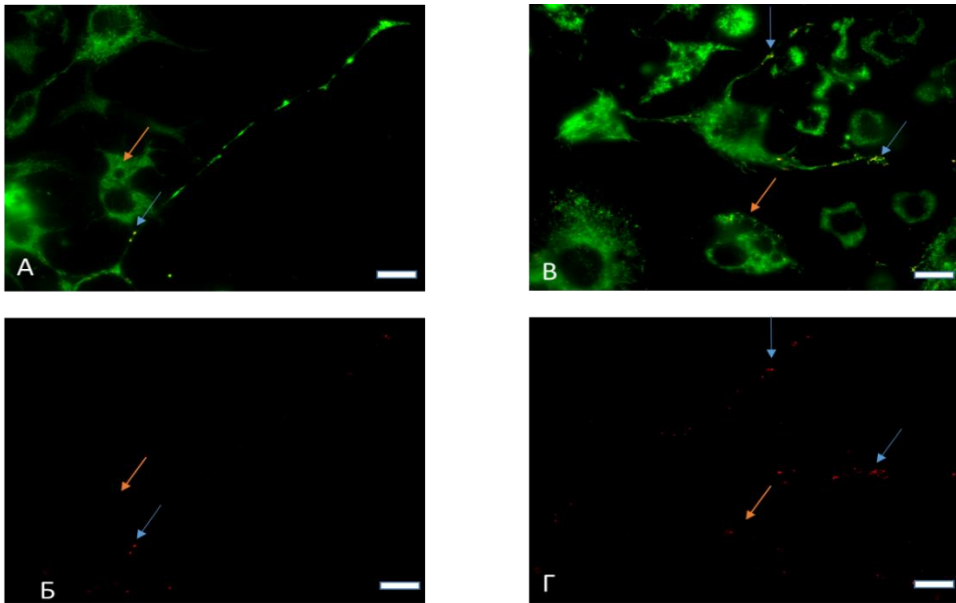
Для анализа полученных данных использовали программу с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений ImageJ NIH (National Institute of Health, USA) версии 1.37.

Мы показываем, что митохондрии с высоким мембранным потенциалом сосредотачиваются в отростках нейронов, тогда как в сомах находятся органеллы со сравнительно низким потенциалом.

Мы также показываем, что виментин преимущественно локализуется в отростках нейронов и что нейроны с виментином имеют более высокий потенциал, чем нейроны без этого белка. Эти данные указывают на роль виментина в регуляции мембранного потенциала митохондрий и распределении этих органелл в разные отделы нейронов.

Выводы

1. Митохондрии с высоким потенциалом сосредотачиваются в отростках нейронов
2. Виментин при дифференциации нейронов распределяется в отростки
3. В клетках CAD с виментином митохондрий с высоким потенциалом больше, чем в клетках CAD без виментина



→ недифференцированные клетки (без отростков)
→ - дифференцированные клетки (с отростками)

Рисунок 1. Зависимость мембранного митохондриального потенциала от стадии дифференцировки клеток CAD.

На рисунке показаны дифференцированные (голубые стрелки) и недифференцированные (оранжевые стрелки) клетки CAD, окрашенные потенциал-чувствительной краской JC-1. Эти результаты говорят о том, что митохондрии с более высоким потенциалом сосредотачиваются в отростках клеток CAD.

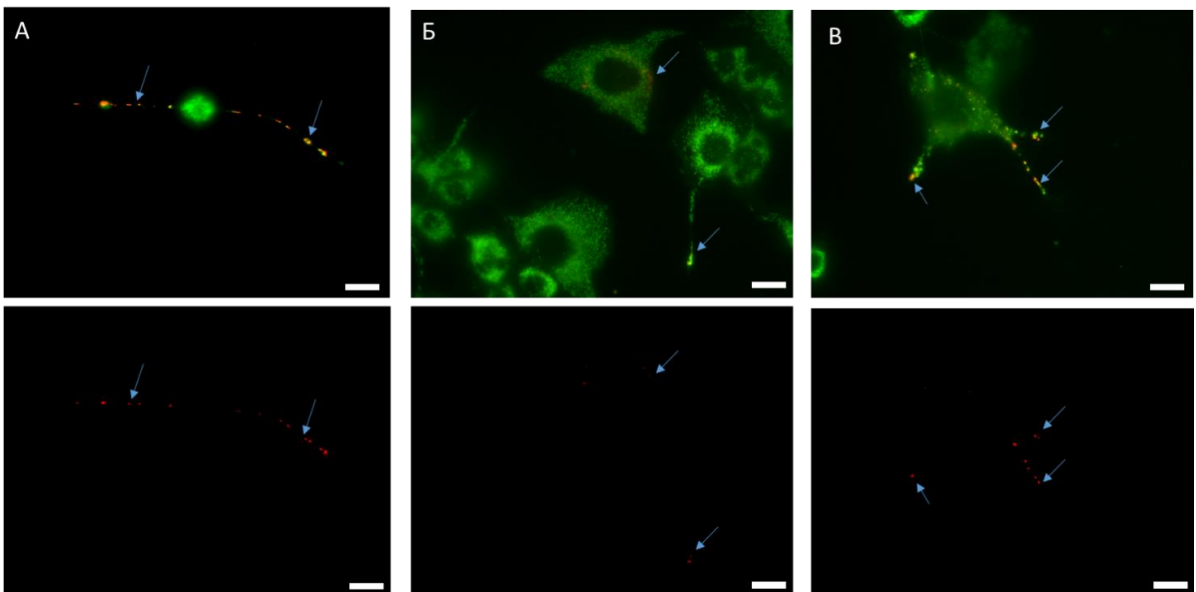


Рисунок 2. Сравнение дифференцированных клеток CAD^{+/+} и CAD^{-/-}, покрашенных потенциал-чувствительной краской JC-1. На рисунке показаны клетки CAD^{+/+} и CAD^{-/-}, окрашенные разными концентрациями JC-1. Голубые стрелки указывают на митохондрии, где образовались J-агрегаты.

Этот результат говорит о том, что в клетках CAD^{+/+} (с виментином) больше митохондрий с высоким мембранным потенциалом, чем в клетках CAD^{-/-} (без виментина).

Литература

1. Chernoivanenko I.S. et al. Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments //The FASEB Journal. – 2015. – Т. 29. – №. 3. – С. 820.

2. Israeli E. et al. Intermediate filament aggregates cause mitochondrial dysmotility and increase energy demands in giant axonal neuropathy //Human molecular genetics. – 2016. – Т. 25. – №. 11. – С. 2143-2157.

УДК 57.083.24

Выделение и описание новых бактериофагов Белого моря

А.С. Кузнецов¹, Н.И. Пушкина², М.А. Летарова^{1,2}, Е.Е. Куликов^{1,3}, П.А. Иванов¹, А.В. Летаров^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Вирусы бактерий, или бактериофаги представляют собой самую многочисленную группу живых объектов в морских системах. Миллилитр морской и океанической воды содержит в среднем 10^7 фаговых частиц [1]. Размножение этих вирусов в бактериях-хозяевах в процессе литического цикла не только поддерживает указанную выше концентрацию вирионов в среде, но и обеспечивает контроль численности бактерий, что играет ключевую роль в поддержании гомеостаза морских местообитаний и оказывает влияние на ключевые экологические процессы водных систем [2,3]. Помимо распространения в виде вирусных частиц, умеренные бактериофаги могут размножаться в лизогенном цикле в виде профагов. По современным представлениям около 25% известных фаговых геномов представлено профагами, а некоторые бактериальные геномы на 20% состоят из профаговых последовательностей [4]. Размножение умеренных фагов часто сопряжено с горизонтальным переносом генов и изменением свойств клетки-хозяина, что на популяционном уровне приводит к изменениям в структуре морской экосистемы [5]. Тем не менее, вирусы бактерий остаются одними из наименее изученных морских объектов.

Выделение новых пар «фаг-хозяин» из естественных морских местообитаний позволит пролить свет на экологические особенности фаговой инфекции в условиях моря, приблизив нас к пониманию комплексных взаимоотношений между вирусами и прокариотами. Помимо этого, методические принципы отбора, культивирования и анализа свойств бактериофагов, выделенных из полевого материала, могут быть применены при разработке соответствующих методов для вирусов патогенных микроорганизмов.

В ходе вирусологической практики на Беломорской биостанции МГУ были получены накопительные культуры бактерий и накопительные культуры фагов. Накопительные культуры бактерий получали путем посева содержимого кишечника пескожила *Arenicola marina* или измельченных рецептакул и воздушных пузырей фукуса *Fucus vesiculosus* методом «истощающего шпателя» на агаризованную среду. Накопительные культуры бактериофагов получали инкубированием тех же образцов в жидкой питательной среде при качании. Для каждого образца готовили дополнительную накопительную культуру фага с митомицином С в качестве индуктора профагов из лизогенных клеток для выделения умеренных вирусов. Далее с целью получения чистых культур бактерий осуществляли пересев единичных колоний бактерий и анализ чистоты культуры методом световой микроскопии. Также на среде с жидким парафином и неорганическими биогенами были выделены культуры углеводород-эмульгирующих бактерий (УВЭБ). Для получения накопительных культур фагов УВЭБ разработали «фаговую ловушку» оригинального устройства (рис. 1), которая была успешно апробирована в зоне причала биостанции.

Выделенные чистые культуры использовали для создания на твердых питательных средах «бактериальных газонов», на которые наносили осветленные накопительные культуры фагов. При наличии на таких газонах зон лизиса, лизирующий агент перевивали методом перекола на новый «бактериальный газон» той же культуры. Участки отдельных переколов, на которых воспроизводился лизис, вырезали, ресуспендировали и осуществляли посев данного фага с получением отдельных бляшек. Бляшки вырезали, перемещали в жидкую культуру того же бактериального хозяина и инкубировали в течение ночи. Полученные таким образом лизаты затем осветляли центрифугированием, фильтровали и титровали по Грациа на культурах чувствительных к данному фагу хозяев. Результаты титрования приведены в таблице 1.

Некоторые изоляты бактериофагов анализировали методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) с контрастированием раствором 1%-го ацетата уранила в метаноле (рис. 2). Изученные таким образом фаги EM-2-1 и RM-2-1 имеют морфологию подовирусов.

В ходе данного исследования была отработана технология выделения пар «фаг-хозяин» из различных источников на территории Беломорской биостанции МГУ, а также собрана и описана коллекция вирусов и их бактериальных хозяев, которая может быть использована в дальнейшем для более быстрого выделения и идентификации вирусов и бактерий Белого моря.

Таблица 1. Характеристика полученных фаговых лизатов

Источник бактериофага	Изолят фага	Значение биологического титра БОЕ/мл	Изолят бактерии хозяина
Кишечник пескожила	EM-2-1	2×10^{10}	Am2/2
Рецептакулы фукуса	R-4-1	$3,2 \times 10^8$	Pre4/3
	R-4-2	$2,8 \times 10^9$	Pre4/3
	RM-2-1	$3,6 \times 10^{10}$	Am2/2
Воздушные пузыри фукуса	BM-1-1	$1,2 \times 10^{10}$	Pre1/16
	BM-3-1	$1,2 \times 10^9$	Pre1/16
«Фаговая ловушка» с культурами УВЭБ	HCO-1	6×10^9	HCC «MB»
	HCO-2	6×10^9	HCC «MB»

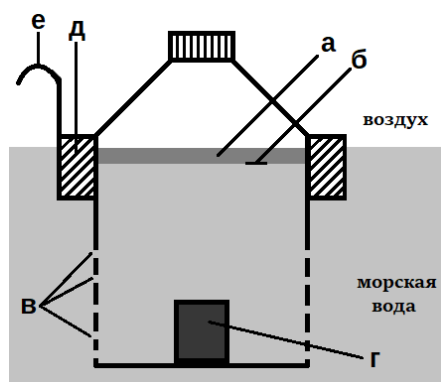


Рисунок 1. Схема «фаговой ловушки»: а – жидкий парафин с добавлением смеси накопительных культур УВЭБ; б – граница фаз углеводороды-вода, где предположительно скапливаются УВЭБ; в – отверстия в нижней части ловушки для обеспечения свободного обмена морской воды с внешней средой; г – груз для поддержания вертикального положения ловушки; д – поплавок; е – крепление ловушки к причалу.

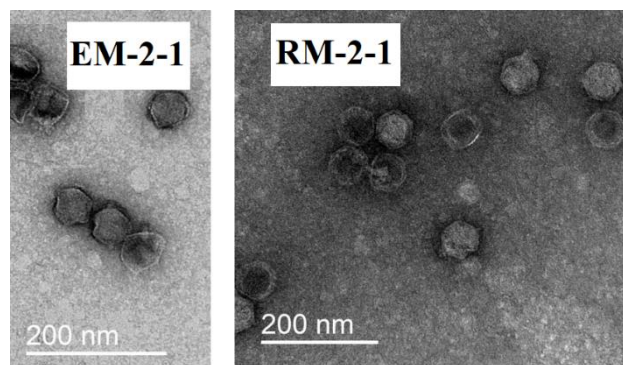


Рисунок 2. Электронные микрофотографии фаговых частиц.

Литература

1. *Breitbart M.* Marine viruses: truth or dare //Annual review of marine science. – 2012. – Т. 4. – С. 425-448.
2. *Fuhrman J.A.* Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects //Nature. – 1999. – Т. 399. – №. 6736. – С. 541-548.
3. *Rohwer F., Thurber R V.* Viruses manipulate the marine environment //Nature. – 2009. – Т. 459. – №. 7244. – С. 207-212.
4. *Casjens S.* Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? //Molecular microbiology. – 2003. – Т. 49. – №. 2. – С. 277-300.
5. *Sime-Ngando T.* Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems //Frontiers in microbiology. – 2014. – Т. 5. – С. 355.

УДК 57.085.23

Формирование полых 3D конструкций из тканевых сфероидов методом фототермии с PLAL наночастицами

Тканевая инженерия направлена на разработку искусственных тканей для замены пораженных органов, их восстановления или облегчения регенерации. На пути к клиническому применению 3D биопечати проблемой является изготовление тканевых конструкций с сетью перфузируемых каналов, которые помогут имплантам быстро интегрироваться в сосудистую сеть пациента. В работе предлагается сочетание обыкновенных тканевых сфероидов и сфероидов, содержащих PLAL наночастицы, для создания тканевых конструкций со сложной геометрией. Клетки можно превратить в материал, удаляемый в процессе формирования, сделав их чувствительными к физическим или химическим факторам, вызывающим клеточную гибель [1]. Известно, что повышение температуры до 45-60 °С вызывает запуск апоптоза, позволяя селективно удалять погибшие клетки. Направленная фототермия достигается за счет использования наноразмерных частиц, которые преобразуют электромагнитную энергию в тепло, позволяя осуществлять контролируемый нагрев для достижения цитотоксических температур при небольших концентрациях. Сопутствующий ущерб окружающим тканям сводится к минимуму за счет локализации целевых наночастиц внутри клеток сфероидов [2].

Оценка цитотоксичности частиц Та и LaB₆, а также дальнейшее формирование сфероидов производились на клеточных культурах A549, CHO, SKOV-3 и НЕК293. Для подбора подходящей концентрации наночастиц был проведен МТТ тест в течение 48 ч. Затем клетки и наночастицы в концентрации 150 мкг/мл засеивали в специальные молды, изготовленные из 2 % раствора агарозы, на 24 ч для формирования сфероидов [3]. Наилучшую морфологию показали сфероиды из клеточной линии НЕК293, собранные из 8 тысяч клеток каждый. Их нагрев осуществляли через 24 ч после начала эксперимента в объеме 250 мкл в эппендорфах с помощью лазера с длиной волны 808 нм до температур от 50 до 70 °С, что соответствует диапазону, при котором наблюдается гибель клеток в процессе гипертермии. Выживаемость оценивали по сравнению интенсивности красителей на фотографиях, сделанных на флюоресцентном микроскопе, и коэффициенту корреляции Пирсона. Использовались 2 красителя: пропидий йодид (PI), окрашивающий некротические клетки и акридиновый оранжевый (АО), связывающийся с ДНК клеток как живых, так и подвергшихся клеточной гибели.

Наночастицы LaB₆ продемонстрировали более высокую цитотоксичность, но вместе с этим и более высокую скорость нагрева при равных концентрациях наночастиц по сравнению с Та, что делает их наиболее перспективным материалом для 3D биопечати. Также был определен оптимальный диапазон температур нагрева сфероидов: показано, что температуры нагрева ниже 55 °С не являются достаточными для того, чтобы вызвать всеобщую клеточную гибель, так как в сфероидах погибали только клетки, находящиеся ближе к центру, однако нагрев выше 65 °С вызывал гибель большинства клеток в сфероидах без наночастиц, что является неблагоприятным фактором для использования метода фототермии при тканевой инженерии.

Литература

1. Robu A., Mironov V., Neagu A. Using Sacrificial Cell Spheroids for the Bioprinting of Perfusable 3D Tissue and Organ Constructs: A Computational Study// Computational and Mathematical Methods in Medicine, vol. 2019, Article ID 7853586, 9 pages, 2019.
2. Cherukuri P., Glaser E. S., Corley S.A. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. Adv. Drug Delivery Rev. 62, 339-345 (2010).
3. Koudan E.V., Gryadunova A.A., Karalkin P.A., Korneva J.V., Meteleva N.Y., Babichenko I.I., Volkov A.V., Rodionov S.A., Parfenov V.A., Pereira F.D.A.S. et al. Multiparametric analysis of tissue spheroids fabricated from different types of cells. Biotechnol. J. 2020, 15, e1900217.

УДК 577.29

Исследование SSB-белков и экзонуклеаз бактериофагов как перспективных агентов в системе редактирования генома CRISPR/Cas9

К.С. Евменов^{1,2}, Н.А. Пустогаров¹, Д.Ю. Пантелеев³, Е.З. Алкалаева^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН

Эпоха повсеместного использования молекулярных инструментов, способных точно вносить определенные нуклеотидные замены в геном, вероятнее всего в будущем будет названа “началом новой эры в

биологии”. Не исключено, что эта эпоха наступит в ближайшие десятилетия. Основной преградой для вступления человечества в новую эру является относительно низкая эффективность найденных и разработанных ранее систем редактирования генома [1].

Например, широко известная система редактирования CRISPR/Cas9 способна точно вносить двухцепочечные разрывы в последовательность ДНК организма, но само редактирование генома осуществляется посредством клеточных механизмов репарации ДНК. У клеток есть два основных пути восстановления целостности генома после появления двухцепочечных разрывов: негомологичное соединение концов (NHEJ) и гомологичная рекомбинация (HDR). Для клеток животных, в том числе и человека, преимущественной является NHEJ-репарация, при которой целостность генома восстанавливается путем неспецифической достройки ДНК без использования в качестве референсной гомологичной последовательности. В таком случае в области двухцепочечного разрыва возможно появление случайных мутаций: делеций и вставок нуклеотидов [2].

С низкой вероятностью (около 1%) репарация разрыва нитей ДНК происходит по пути гомологичной рекомбинации, при которой клеткой используется другая молекула ДНК в качестве матричной. Несомненно, этот путь и является наиболее интересным для использования CRISPR/Cas9 в качестве способа вносить изменения в геном. Однако низкий базовый процент HDR требует разработки методик повышения частоты клеточной репарации с помощью гомологичной рекомбинации [1].

Один из способов повысить уровень HDR - внести в систему новые агенты, например, белковой природы. Ранее было показано повышение процента гомологичных рекомбинаций при внесении в клетку генов экзонуклеаз [3]. Нами было выдвинуто предположение, что для этого целесообразно использовать фаговые экзонуклеазы в сочетании с белками, связывающими одноцепочечную ДНК (SSB-белки), так как экзонуклеазы способны стимулировать образование “липких” концов ДНК в месте двухцепочечного разрыва, а SSB-белки могут стабилизировать неспаренные нити ДНК до момента наступления репарации по пути HDR.

Для того, чтобы проверить эту гипотезу, для экспрессии в эукариотических линиях клеток нами были получены генетические конструкции экзонуклеаз, SSB-белков и их химерных форм из бактериофагов T4, T5 и T7. В качестве модели для оценки уровня HDR была использована описанная ранее система трансформации гена GFP в ген BFP [4]. Определение эффективности произошедшей гомологичной рекомбинации осуществлялся с помощью анализа данных проточной цитометрии. Была проведена серия экспериментов, позволяющая оптимизировать этап трансфекции клеточной линии HEK293 конструкциями с компонентами геномного редактора по показателям конфлюентности и последовательности трансфекции. После нахождения оптимальных условий, была проведена серия экспериментов по оценке влияния белков репликации бактериофагов на эффективность HDR.

Оказалось, что исследуемые белки способны повышать эффективность HDR-репарации в клетках. Наибольшей активностью обладали экзонуклеазы, самой активной из которых оказалась экзонуклеаза бактериофага T5. Следует сказать, что SSB-белки также повышают процент HDR, хоть и в меньшей степени, чем экзонуклеазы. Наименьшей активностью обладали химерные формы белков, содержащие как экзонуклеазу, так и SSB-белок соответствующих фагов. Далее для разрешения этой проблемы необходимо провести комплексную работу по поиску оптимальных линкеров между двумя компонентами белков.

Таким образом нами было показано, что белки репликации бактериофагов, такие как экзонуклеазы и SSB-белки, являются перспективными для использования в системе редактирования генома CRISPR/Cas9.

Работа выполнена при поддержке гранта 075-15-2019-1660 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Литература

1. Dow L.E., Fisher J., O'Rourke K.P., Muley A., Kastenhuber E.R., Livshits G., Tschaharganeh D.F., Socci N.D., Lowe S.W. Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology* (2015). 2015 33:4, 33(4), 390–394. <https://doi.org/10.1038/nbt.3155>.
2. Liu M., Rehman S., Tang X., Gu K., Fan Q., Chen D., Ma W. Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Frontiers in Genetics*, (2019). 0(JAN), 691. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2018.00691>.
3. Clements T.P., Tandon B., Lintel H.A., McCarty J.H., Wagner D.S. RICE CRISPR: Rapidly increased cut ends by an exonuclease Cas9 fusion in zebrafish. *Genesis*, (2017). 55(8), e23044. <https://doi.org/10.1002/DVG.23044>.
4. Glaser A., McColl B., Vadolas J. GFP to BFP Conversion: A Versatile Assay for the Quantification of CRISPR/Cas9-mediated Genome Editing. *Molecular therapy. Nucleic acids*, (2016). 5(7), e334. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.48>.

УДК 577.29

Stabilizing effect of mRNA poly(A) tail on assembly of ribosomal pretermination complexes

Salman^{1,2}, N. Biziaev¹, E. Alkalaeva^{1,2,3}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, The Russian Academy of Sciences

²Moscow Institute of Physics and Technology

The poly(A) tail is an important structure of almost all eukaryotic mRNAs. The poly(A) tail stabilizes the RNA molecule and prevents its degradation. The main protein responsible for the effect of the poly(A) tail is poly(A)-binding protein (PABP). PABP interacts both with the mRNA and with a number of translation factors, deadenylation complexes, and other cellular complexes. It was shown that PABP stimulates the efficiency of translation termination through interaction with the complex of translation termination factors eRF1-eRF3. However, the poly(A) tail direct influence on the stability of pretermination complexes on different stop codons is not known yet.

To evaluate that influence, we used Termini-Luc assay [1]. We obtained purified pretermination ribosomal complexes (preTCs) terminated at a stop codon of nanoluciferase coding sequence. The nanoluciferase mRNAs used in the study differed in: 1) stop codon type (UAA, UAG, UGA); 2) the distance between the stop codon and the poly(A) tail (0, 10, 30 nt); 3) the presence or absence of poly(A) tail 50 nt length. The luminescent signal of nanoluciferase in a probe strongly correlates with the amount of assembled preTC. Due to that, it is possible to evaluate the efficiency of preTC assembly.

We observed that efficiency of preTC assembly and its stability show different tendency according to the stop codon itself, the existence and the distance of poly(A) tail. Moreover, the efficiency of preTC assembled *in vitro* can be directly controlled by these conditions. The data obtained are consistent with the concept of the proximity of the poly(A) tail to the stop codon during termination and subsequent release of the polypeptide. In particular, the work proves the need for convergence of the poly(A) tail and the stop codon for efficient assembly of pretermination complex.

The study was supported by the Russian Science Foundation Grant No. 23-24-00382, <https://rscf.ru/project/23-24-00382/>

References

1. Susorov D., Egri S., Korostelev A.A. Termini-Luc: a versatile assay to monitor full-protein release from ribosomes // RNA. - 2020. - 26. - No. 12. - P. 2044-2050

УДК 571.27

Сравнительный анализ определения эозинофилов при помощи проточной цитометрии и дифференциального окрашивания цитологических препаратов

Д.Е. Мурова^{1,2}, Е.Л. Болховитина¹, Ю.Д. Вавилова¹, Е.А. Сервули^{1,3}, М.А. Шевченко¹.

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

³ Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН,

Исследование механизмов болезней людей, необходимые для подбора оптимальной терапии, часто требуют использование моделей заболеваний на животных. Так, в случае аллергической бронхиальной астмы, модель аллергического воспаления дыхательных путей у мышей хорошо описана и используется в большом количестве исследований [1]. Основным параметром, который свидетельствует о развитии аллергического воспаления является увеличение количества эозинофилов [2]. Повышение доли эозинофилов под воздействием аллергена характерно не только для дыхательных путей, но и для клеток крови и костного мозга [3]. Традиционно оценку эозинофилов проводят при помощи дифференциального окрашивания цитологического препарата [4], однако, в последнее время, используют более высокотехнологичный метод – проточную цитометрию [5]. В отличие от дифференциального окрашивания, требующего зрительной оценки исследователя, проточный цитометр детектирует клетки автоматически, что позволяет быстро проводить анализ большого количества образцов, но не позволяет проводить визуальный контроль за тем, какие именно клетки приняты за эозинофилы.

Целью данной работы было настроить идентификацию эозинофилов в препаратах костного мозга мышей при помощи проточной цитометрии таким образом, чтобы результаты воспроизводились при оценке доли эозинофилов визуально с использованием дифференциально окрашенных цитологических образцов.

В данной работе нами было индуцировано аллергическое воспаление дыхательных путей у мышей линии CD-1 посредством многократного орофарингеального введения аллергена – экстракта гриба *Aspergillus fumigatus*. Костный мозг мыши обрабатывали гемолизирующим буфером с целью избавиться от эритроцитов, затем часть осаждали на стекла при помощи цитоцентрифуги, а часть переводили в буфер для окрашивания и цитометрии. Дифференциальное окрашивание проводили при помощи набора «Диахим-Дифф-Квик». Для анализа при помощи проточной цитометрии использовали следующие антитела (Miltenyi Biotec) против

антигенов мыши: Ly6G и SiglecF для специфического окрашивания эозинофилов, CD3, CD19, Ter119, CD11c, NK1.1, CD115 для исключения неспецифического окрашивания.

Специфические гранулы эозинофилов содержат щелочной белок (main basic protein) MBP, связывающий кислый ярко розовый краситель эозин, что позволяет легко идентифицировать эозинофилы в цитологических препаратах (рис. 1А). При использовании стандартной схемы гейтирования (рис. 1В, синие стрелки) доля эозинофилов в костном мозге мышей с индуцированной астмой достоверно повышалась по сравнению с контролем, как при подсчете дифференциально окрашенных цитологических препаратов, так и при анализе при помощи цитометрии (рис. 1С, cytospin и cytometry, соответственно). Однако, в случае мышей с индуцированной астмой, данные, полученные при помощи дифференциального окрашивания, достоверно отличались от данных, полученных при помощи цитометрии (рис. 1С). Так как при дифференциальном окрашивании нет разделения на живые и мертвые клетки, была предпринята попытка определения эозинофилов из общего пула клеток (рис. 1 В, голубая стрелка). При таком подходе, доля эозинофилов повышалась (рис. 1С), однако, обратное гейтирование показало, что клетки, определяемые как эозинофилы, лежат за пределами морфологически определяемой популяции гранулоцитов (рис. 1D, левый плот), в то время как эозинофилы, определенные с применением стандартной схемы, обладают ожидаемой морфологией (рис. 1D, правый плот). Вариации гейтирования живых клеток не оказывали влияния на долю эозинофилов, тогда как более строгое исключение негранулацитарных предшественников позволяло добиться результатов, достоверно не отличающихся от полученных путем дифференциального окрашивания (рис. 1В, С).

Таким образом, при определении эозинофилов в препаратах костного мозга при помощи проточной цитометрии необходимо использовать стандартную схему и тщательно исключать негранулацитарные предшественники.

Работа выполнена при поддержке РФФ, проект 23-25-00258

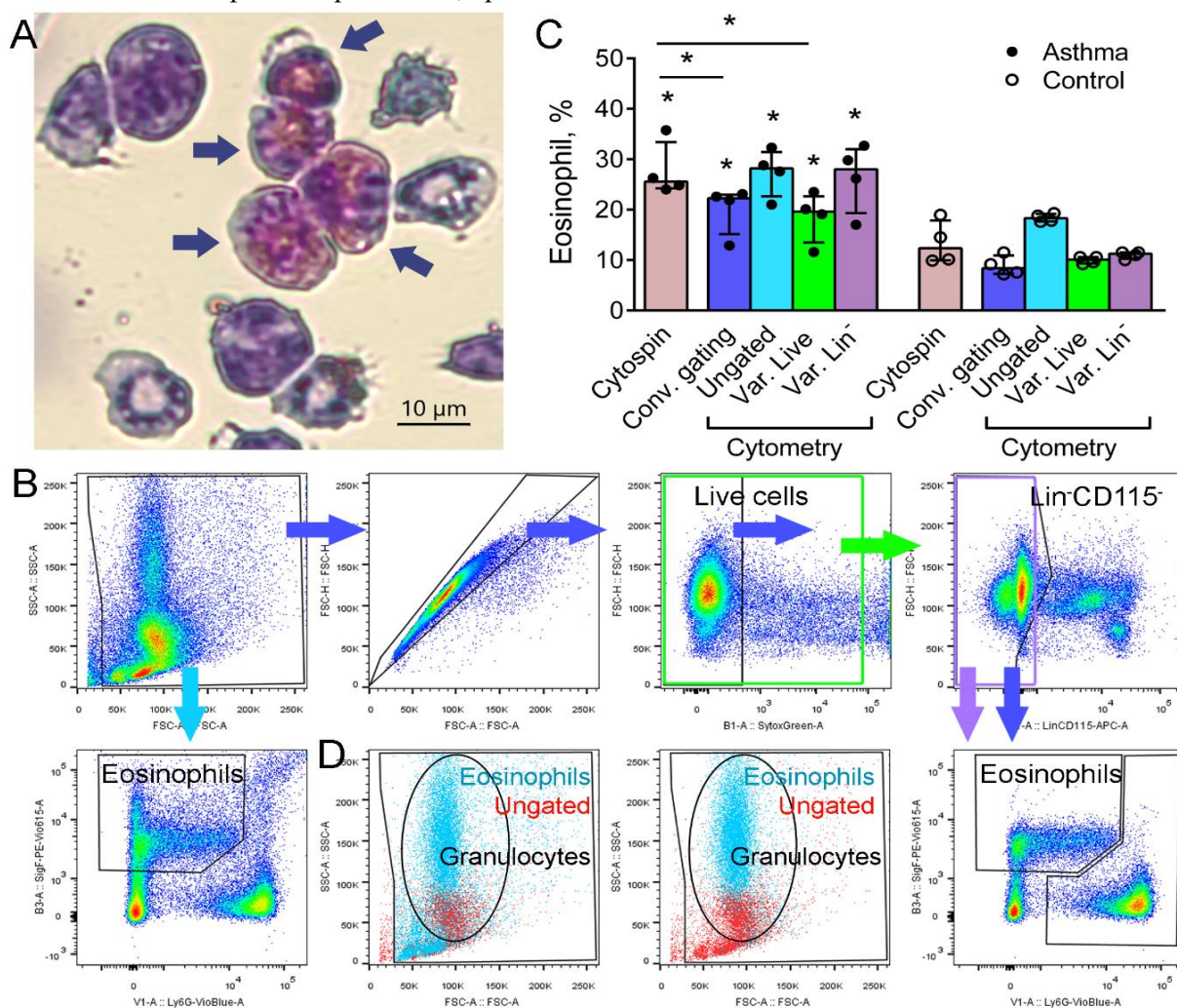


Рисунок 1. Определение доли эозинофилов среди клеток костного мозга мыши. А. Дифференциально окрашенный цитологический препарат костного мозга мыши. Стрелками обозначены эозинофилы. Масштаб 10 мкм. В. Стандартная схема определения эозинофилов среди клеток костного мозга при помощи проточной цитометрии (синие стрелки). Популяция эозинофилов, выделенная из общего пула клеток (голубые стрелки). Измененный гейт живых клеток обозначен зеленым. Измененный гейт, отсекающий предшественников лимфоцитов и макрофагов обозначен фиолетовым. С. Доли эозинофилов, определенные при помощи дифференциального окрашивания (розовые столбцы), или при помощи цитометрии с использованием стандартного схемы (синие столбцы), из общего пула клеток (голубые

столбцы), с измененным гейтом живых клеток (зеленые столбцы), с измененным гейтом, отсекающим клетки-предшественники лимфоцитов и макрофагов (фиолетовые столбцы). Данные представлены в виде медиан и I.Q.R., (n = 4); достоверные различия с соответствующей контрольной группой или, если указано, между группами * p ≤ 0,05. D. Определение морфологических характеристик, полученных выделением на различных этапах схемы гейтирования эозинофилов: слева – из общего пула, справа – по стандартной схеме.

Литература

1. Debeuf N. et al. Mouse Models of Asthma. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2016 Jun 1;6(2):169-184. doi: 10.1002/cpmo.4.
2. Possa S.S. et al. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. *Front Pharmacol.* 2013 Apr 17;4:46. doi: 10.3389/fphar.2013.00046.
3. Sitkauskiene, B. et al. Airway allergen exposure stimulates bone marrow eosinophilia partly via IL-9. *Respir Res* 6, 33 (2005). <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-33>.
4. Meyer KC et al. American Thoracic Society Committee on BAL in Interstitial Lung Disease. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 May 1;185(9):1004-14. doi: 10.1164/rccm.201202-0320ST.
5. Daubeuf F et al. A Fast, Easy, and Customizable Eight-Color Flow Cytometric Method for Analysis of the Cellular Content of Bronchoalveolar Lavage Fluid in the Mouse. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2017 Jun 19;7(2):88-99. doi: 10.1002/cpmo.26.

УДК 571.27

Поиск антиген-специфичных Т-лимфоцитов при патологиях Е. Рыжиченко^{1,2}, А.И. Изосимова³, К.Г. Корнева^{3,4}, Г.В. Шаронов^{1,3}

¹НИИ трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

³Приволжский исследовательский медицинский университет

⁴Городская клиническая больница № 13, г. Нижний Новгород, Россия

Иммунная система играет важную роль в большинстве патологических процессов, таких как инфекционные и онкологические заболевания. Кроме того, она сама может являться их причиной, например, в случае аллергий, хронических воспалительных процессов и аутоиммунных патологий [1, 2]. В основе устойчивой иммунной реакции лежат клетки адаптивного иммунитета, ключевыми из которых являются хелперные и регуляторные CD4⁺ Т-лимфоциты. Идентификация антиген-специфичных CD4⁺ лимфоцитов является ключевым этапом для проведения селективной иммунотерапии и/или контроля эффективности селективной и неселективной терапий [3]. Антигенами, в зависимости от патологии, являются чужеродные молекулы, опухолевые или собственные антигены.

Наша работа посвящена оптимизации методики поиска и выделения антиген-специфичных клеток путем их стимуляции антигеном *in vitro*. При этом было изучено: какие клетки презентуют пептидные антигены CD4⁺ Т-лимфоцитам, какие маркеры наиболее селективны по отношению к антиген-специфичным клеткам и при каких условиях происходит преимущественная активация хелперных или регуляторных клеток.

Полученные данные указывают, что в качестве антигенпрезентирующих клеток выступают преимущественно В-лимфоциты, а наиболее избирательными маркерами антиген-специфичной активации Т-лимфоцитов являются МНС-II и CD20. При этом экспрессия МНС-II растет по мере пролиферации клеток, а уровень CD20 максимален на начальной стадии активации, но впоследствии падает. Мы полагаем, что подобная кинетика экспрессии CD20 Т-лимфоцитами связана с тем, что он передается с В-лимфоцитов путем трофоцитоза, при котором плотно взаимодействующие клетки обмениваются фрагментами плазматической мембраны.

Полученные результаты были использованы нами для выделения клеток, специфичных к антигенам меланомы B16 у мышей и аутоантигенам у пациентов с диабетом 1 типа.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ22-15-20072.

Литература

1. Sattler S. The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. Т. 1003. С. 3-14.
2. Zhang H., Chen J. Current status and future directions of cancer immunotherapy // *J. Cancer.* 2018. Т. 9. № 10. С. 1773-1781.
3. Zanetti M. Tapping CD4 T Cells for Cancer Immunotherapy: The Choice of Personalized Genomics // *J. Immunol.* 2015. Т. 194. № 5. С. 2049-2056.

УДК 577.217.563

Изучение функциональной активности изоформы 2 eRF1 человека А.А. Клишин^{1,2}, А.В. Шувалов^{1,3}, Е.Ю. Шувалова^{1,3}, Е.З. Алкалаева^{1,3}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины

Терминация трансляции — это заключительный этап в реализации генетической информации в ходе которого происходит высвобождение новосинтезированной полипептидной цепи из рибосомы при распознавании стоп кодона мРНК фактором терминации eRF1. eRF1 состоит из N-, M- и C- доменов. Консервативные мотивы GTS, NIKS и YxCxxxF N-домена eRF1 непосредственно взаимодействуют со стоп кодоном [1,2]. M- и C-домены eRF1 в присутствии ГТФ взаимодействуют с дополнительным фактором eRF3, который стимулирует терминацию за счет ГТФазной активности. Комплекс eRF1-eRF3a эффективно распознает стоп кодон в А-сайте рибосомы, а последующий гидролиз ГТФ приводит к репозиционированию M-домена eRF1 в пептидил-трансферазный центр рибосомы [3], где его ультраконсервативный мотив GGQ осуществляет гидролиз пептидил-тРНК [4]. Основная изоформа eRF1 человека хорошо изучена. Однако, у человека аннотировано несколько альтернативных сплайс вариантов транскриптов гена *ETF1*, кодирующих дополнительную вторую изоформу eRF1 (eRF1iso2). Функциональная активность eRF1iso2 остается не изученной. eRF1iso2 отличается от основной формы отсутствием первых 33 аминокислотных остатков на N-конце, включая GTS-мотив, необходимый для распознавания стоп-кодона. С помощью ресурса ISOexpresso мы выявили, что транскрипты, кодирующие eRF1iso2 экспрессируются на уровне до 5% от уровня основного транскрипта [5]. С помощью транскриптомного браузера для визуализации данных рибосомного профилирования мы выяснили, что транскрипты, кодирующие eRF1iso2, транслируются [6].

С помощью экспрессионных конструкций, кодирующих eRF1iso1 и eRF1iso2 для *E. coli* и бакуловирусной системы экспрессии мы получили и очистили соответствующие рекомбинантные препараты изоформ eRF1 и исследовали *in vitro* их активность в терминации трансляции. Мы обнаружили, что eRF1iso2 (как и eRF1iso1) способен образовывать комплекс с eRF3a, но этот комплекс не активен: eRF1iso2 не стимулирует ГТФазную активность eRF3a, а eRF3a не стимулирует активность eRF1iso2 в терминации трансляции. Из-за этого в присутствии eRF3a наблюдаемое *in vitro* формирование фактором eRF1iso2 терминационного комплекса значительно ниже (в несколько раз) чем у основной изоформы, а гидролиз пептидил-тРНК в присутствии eRF1iso2 практически не детектируется. Кроме того, мы обнаружили, что eRF1iso2 ингибирует трансляцию в лизатах клеток человека

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-01019, <https://rscf.ru/project/22-24-01019/>

Литература

1. Bulygin K.N., Khairulina, Y.S., Kolosov P.M., Ven'yaminova A.G., Graifer D.M., Vorobjev Y.N., Karpova G.G. Three distinct peptides from the N domain of translation termination factor eRF1 surround stop codon in the ribosome. *Rna*, (2010) 16(10), 1902-1914.
2. Brown A., Shao S., Murray J., Hegde R.S., Ramakrishnan V. Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes. *Nature*, (2015) 524(7566), 493-496. <https://doi.org/10.1038/nature14896>
3. Preis A., Heuer A., et al. Cryoelectron microscopic structures of eukaryotic translation termination complexes containing eRF1-eRF3 or eRF1-ABCE1. *Cell reports*, (2014) 8(1), 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.058>
4. Frolova L.Y., Tsvikovskii R.Y., Sivolobova G.F., et al Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *Rna*, (1999) 5(8), 1014-1020.
5. Yang I.S., Son H., Kim, S., Kim S. ISOexpresso: a web-based platform for isoform-level expression analysis in human cancer. *BMC genomics*, (2016). 17, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2852-6>
6. Kiniry S.J., O'Connor P.B.F., Michel A.M., Baranov P.V. Trips-Viz: a transcriptome browser for exploring Ribo-Seq data. *Nucleic acids research*, (2019) 47(D1), D847-D852. <https://doi.org/10.1093/nar/gky842>

УДК 577:576.3 615

Влияние свободных жирных кислот с длинной цепью на метаболизм различных клеток человека *in vitro*

Х.С. Вишнякова¹, К.В. Попов¹, Х. Рап^{1,2}, М.В. Ясько¹, Е.Е. Егоров¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Механизмы действия свободных жирных кислот (СЖК) на клетки человека чрезвычайно разнообразны. Жирные кислоты являются источником энергии для организма, обеспечивая образование АТФ путем β-окисления. СЖК входят в состав мембран и участвуют в разобщении митохондрий. СЖК являются лигандами различных поверхностных и внутриклеточных рецепторов, которые влияют на энергетический метаболизм, регулируя обмен глюкозы и биогенез митохондрий [1]. СЖК также являются предшественниками огромного семейства простаноидов (простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов, резолвинов и др.),

играющих важную роль в воспалительных процессах [2]. Целью данного исследования было всестороннее исследование действия СЖК на разные типы клеток в культуре.

В экспериментах были использованы фибробласты, клетки печени и почек, нейробласты, кератиноциты, культуры макрофагов и миобласты. При добавлении пальмитиновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, конъюгированной линолевой, элаидиновой кислот и их смесей изучали: токсичность, активацию лизосом и образование липидных включений. Также исследовали изменение клеточного метаболизма (преимущественно гликолиза), влияние СЖК как разобщителей на окислительное фосфорилирование и изменение экспрессии отдельных генов.

Результаты показали, что добавление СЖК с длинной цепью вызывает разнообразные эффекты в культивируемых клетках различного типа. В клетках (прежде всего в гепатоцитах и мышечных клетках) начинают накапливаться липиды, в них активируется первый этап аутофагии (активация лизосом) (рис. 1) и происходит разобщение окислительного фосфорилирования. Хотя потребление кислорода клетками увеличивается, их энергетический метаболизм сдвигается в пользу гликолиза (рис.2). Все эти эффекты выражены в разной степени в разных клетках и при добавлении разных СЖК. Обсуждаются механизмы действия СЖК, а также возможные биологические и медицинские приложения полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-04-01071.

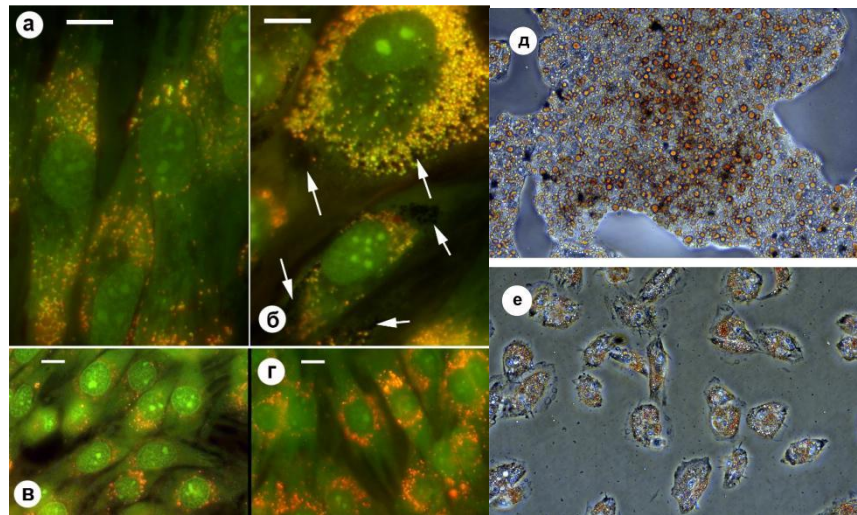


Рисунок 1. Активация лизосом (а,б,в,г) и накопление липидов (д,е). а,б -- клетки 977, в,г -- клетки L6, д -- клетки Нер G2, е -- клетки Сакі.

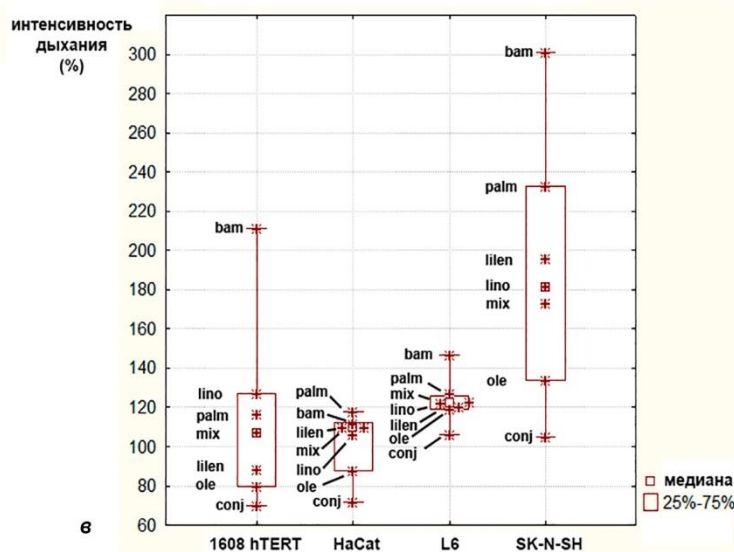


Рисунок 2. Потребление кислорода клетками при добавлении СЖК.

Литература

1. Nakamura M.T., Yudel B.E., Loor J.J. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress Lipid Res.* (2014) 53, 124–144.

УДК 577.175.722

Влияние экспрессии мутантных вариантов гена инсулина на разные системы стрессового ответа клеток

М.Р. Исаева^{1,2}, Т.С. Краснова², П.М. Рубцов²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН

Мутации в гене инсулина влияют на различные этапы биосинтеза инсулина в β -клетках поджелудочной железы. Мутантные белки, не способные принять нативную конформацию, накапливаются в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), нарушают гомеостаз клетки и могут индуцировать стресс ЭПР. Для сигналинга о стрессе ЭПР эукариотические клетки развили группу путей передачи сигнала, называемую ответом на мисфолдинг (unfolded protein response, UPR). Длительный стресс ЭПР может нарушать нормальное функционирование клетки и активировать апоптотический путь, приводящий к снижению массы β -клеток поджелудочной железы и развитию сахарного диабета [1]. Мутации в гене инсулина могут быть причиной моногенных форм диабета: перманентного неонатального сахарного диабета (ПНСД) и одного из вариантов сахарного диабета взрослого типа у молодых – MODY10. Молекулярно-генетическая диагностика поможет правильно поставить диагноз, подобрать оптимальное лечение для пациента и выявить имеющиеся мутации у асимптоматичных членов семьи.

Целью нашей работы было изучение влияния экспрессии мутантных вариантов гена инсулина, выявленных в ходе молекулярно-генетического исследования у детей с ПНСД и диабетом MODY в НИИЦ эндокринологии, на индукцию путей стрессового ответа клеток.

В ходе данной работы использовали генетические конструкции, содержащие кодирующие последовательности препроинсулина дикого типа и вариантов с однонуклеотидными заменами нуклеотидов SNP1 (с.188-31 G>A) [2] и SNP2 (с.188-15 G>A) в интроне 2 гена инсулина человека, а также варианта с миссенс-мутацией (с.64G>C, р. A22P) в последовательности, кодирующей сигнальный пептид. Ранее в нашей лаборатории было показано, что SNP1 и SNP2 приводят к появлению альтернативных акцепторных сайтов сплайсинга, что сопровождается включением 29 или 13 нуклеотидов интрона 2 в зрелую мРНК. Для определения влияния экспрессии мутантных вариантов на индукцию стрессового ответа, клетки линии *MIN6* (клетки инсулиномы мыши) котрансфицировали полученными генетическими конструкциями и плазмидами, содержащими ген люциферазы, под промоторами, содержащими элементы ERSE, UPR, AARE, и промотором GRP78 с использованием TurboFect (“Thermo Fisher Scientific”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для нормализации на внешние переменные параметры в смесь для трансфекции добавляли контрольную плазмиду, кодирующую ген β -галактозидазы. Через 48 часов клетки лизировали, и в лизатах измеряли сигнал люциферазы и β -галактозидазы. Анализ люциферазной активности проводили с использованием набора ONE-Glo EX Luciferase Assay (“Promega”, США).

Как видно из диаграмм (рис. 1), мутантные варианты SNP1 и SNP2 усиливают транскрипцию с элементов ERSE, UPR, AARE и GRP78, вовлеченных в процесс стрессового ответа клетки. Ранее при помощи иммуноферментного анализа нами было обнаружено, что в клетках, экспрессирующих варианты SNP1 и SNP2, проинсулин, инсулин и С-пептид практически не детектировались [3]. Можно предположить, что данные однонуклеотидные мутации нарушают процессинг проинсулина, а также индуцируют стресс ЭПР.

Ранее нами было показано, что замена A22P в сигнальном пептиде приводит к нарушению синтеза проинсулина, инсулина и С-пептида. Вероятно, данная мутация ведет к нарушению транслокации проинсулина через мембрану ЭПР, поэтому стрессового ответа не наблюдается.

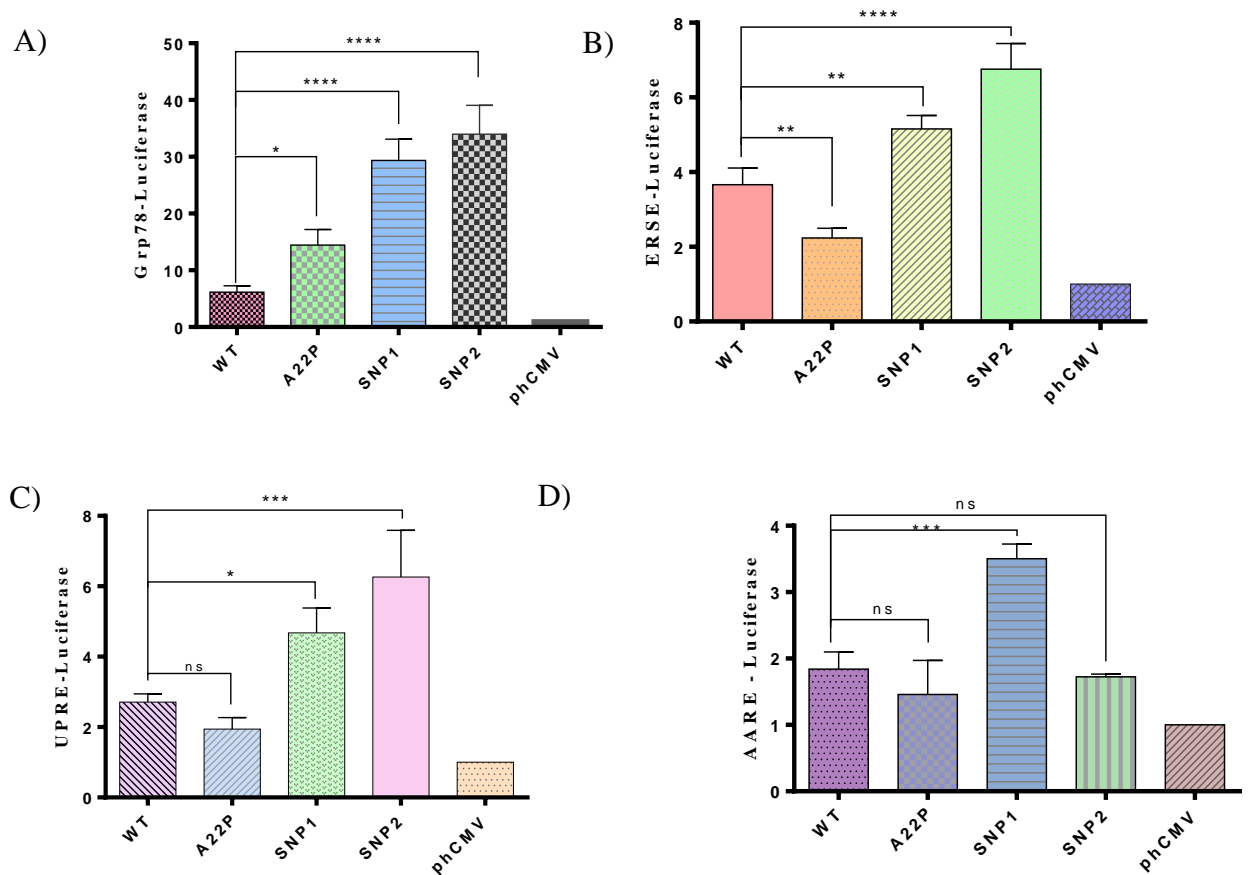


Рисунок 1. Влияние мутаций в гене инсулина на стресс ЭПР в клетках MIN6. Клетки были трансфицированы, плазмидами phCMV, содержащими вставки гена инсулина дикого типа (WT) и мутантных вариантов, а также вектором с репортерным геном люциферазы под контролем промотора гена A) Grp78, B) ERSE, C) UPRE, D) AARE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Литература

1. *Sano R., Reed J.C.* ER stress-induced cell death mechanisms // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.* – 2013. – Т. 1833. – №. 12. – С. 3460-3470.
2. *Garin I. [et al.]* Permanent neonatal diabetes caused by creation of an ectopic splice site within the INS gene // *PLoS One.* 2012 T. 7 № 1 С. 5–9.
3. *Panova A.V. et al.* Aberrant splicing of INS impairs beta-cell differentiation and proliferation by ER stress in the isogenic iPSC model of neonatal diabetes // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2022. – Т. 23. – №. 15. – С. 8824.

УДК 577.2

Анализ функциональности и биораспределения AAV/Olig001, кодирующего ген арилсульфатазы А, в нервной системе свиней

А. Юсеф, А. Ибрахим, А.А. Шаймарданова, А.И. Муллагулова, Ш. Исса, А.А. Шаршакова, В.В Соловьева, Я.О. Мухамедшина, А.А. Ризванов

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет,
Институт Фундаментальной Медицины и Биологии

Метахроматическая лейкоцистрофия (МЛД) — это аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное дефицитом фермента арилсульфатазы А (анг. ARSA), что приводит к накоплению сульфатидов в нейронах и выраженной нейродегенерации [1]. Известно, что капсид аденоассоциированного вируса серотипа Olig001 (AAV/Olig001) обладает преимущественным тропизмом к клеточной поверхности олигодендроцитов [2]. Многие исследования показали способность AAV/Olig001 трансдуцировать олигодендроциты у новорожденных мышей на модели врожденной лейкоцистрофии, что приводит к восстановлению врожденного генетического дефекта [3].

Эта работа была направлена на анализ функциональности и биораспределения AAV/Olig001, кодирующего ген арилсульфатазы А (ARSA) и предназначенного для генной терапии МЛД. AAV/Olig001-ARSA, содержащий уникальную кодон-оптимизированную последовательность кДНК ARSA, вводили интратекально свиньям (n=3) в дозе 1×10^{12} ГК/кг.

Результаты сравнивали с группой интактных животных (n=3). Ферментативную активность ARSA анализировали в спинномозговой жидкости (СМЖ) и органах ЦНС после введения препарата с использованием рNCS (#N7251, Sigma-Aldrich). Экспрессию ARSA анализировали в органах ЦНС с помощью количественной кПЦР и Иммуногестохимии (ИГХ). ИГХ проводили с использованием моноклональных антител к ARSA (#MAG619HU21, Cloud-Clone Corp). Через 28 дней после введения препарата ферментативная активность ARSA в СМЖ статистически значимо возрастала примерно в 2 раза по сравнению с контрольной группой. мРНК кодон-оптимизированного гена ARSA была обнаружена во всех основных органах нервной системы, кроме лобной доли головного мозга. Анализ ИГХ также подтвердил сверхэкспрессию ARSA в затылочной доле головного мозга, коре мозжечка, поясничном отделе спинного мозга и спинномозговых ганглиях того же отдела экспериментальных животных. Таким образом, было показано, что после интратекального введения свиньям AAV/Olig001-ARSA достигает ЦНС и приводит к сверхэкспрессии ARSA. Соответственно, AAV/Olig001 можно рассматривать как перспективный вектор для генной терапии МЛД.

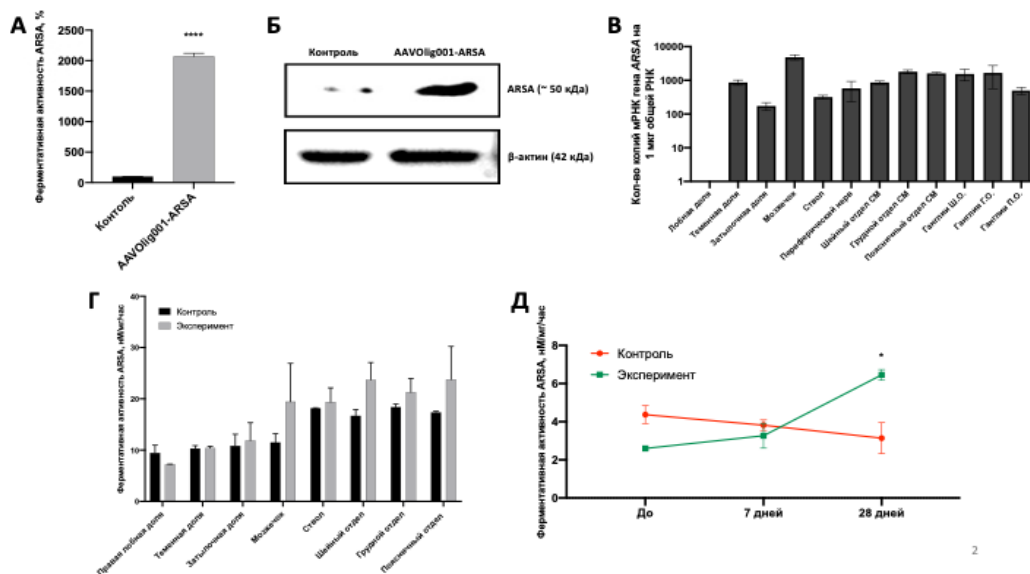


Рисунок 1. А – Анализ ферментативной активности ARSA в лизате клеток SH-SY5Y после трансдукции AAV/Olig001-ARSA. Б – Вестерн-блот анализ сверхэкспрессии белка ARSA в клетках SH-SY5Y после трансдукции AAV/Olig001-ARSA. В – Количество копий мРНК гена ARSA в органах ЦНС свиней на 28 сутки после интратекального введения AAV/Olig001-ARSA. Данные получены с помощью количественной ПЦР. Г – Анализ ферментативной активности ARSA в гомогонатах органов ЦНС свиней после введения AAV/Olig001-ARSA. Д – Анализ ферментативной активности ARSA в СМЖ свиней после введения AAV/Olig001-ARSA. Данные представлены в виде среднего значения ± С.О (n=3) трех биологических повторов.

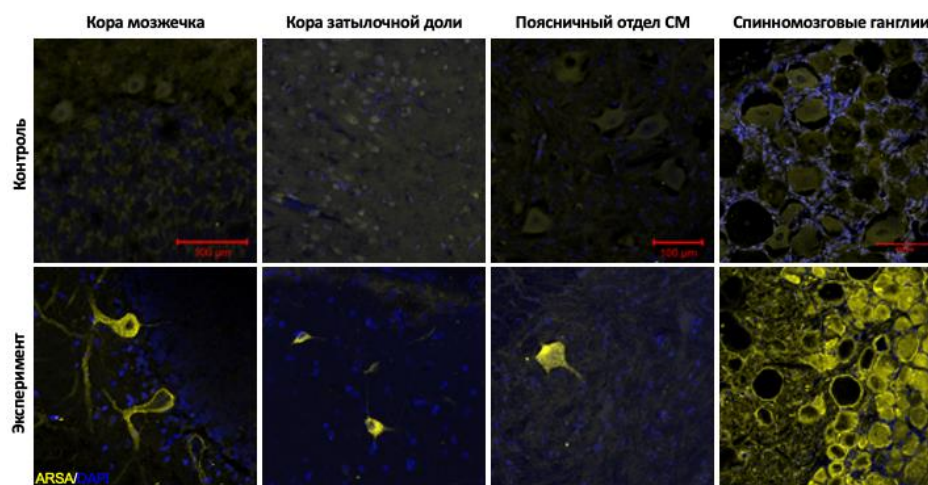


Рисунок 2. Оценка экспрессии ARSA в различных отделах нервной системы у контрольной и экспериментальной групп животных на 28 сутки после инъекции AAV/Olig001-ARSA. Шкала: 100 мкм.

Литература

1. *Shaimardanova A.A., Chulpanova D.S., Solovyeva V.V., Mullagulova A.I., Kitaeva K.V., Allegrucci C., Rizvanov A.A.* Metachromatic Leukodystrophy: Diagnosis, Modeling, and Treatment Approaches. *Front Med (Lausanne)*. 2020; 7:576221.

2. *Powell S.K., Khan N., Parker C.L., Samulski R.J., Matsushima G., Gray S.J., McCown T.J.* Characterization of a novel adeno-associated viral vector with preferential oligodendrocyte tropism. *Gene Ther*. 2016; 23(11):807-814.

3. *Francis J.S., Markov V., Wojtas I.D., Gray S., McCown T., Samulski R.J., Figueroa M., Leone P.* Preclinical biodistribution, tropism, and efficacy of oligotropic AAV/Olig001 in a mouse model of congenital white matter disease. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2021; 20:520-534.

УДК 577.29

Пермеабиллизация лизосомальной мембраны как средство оценки эффективности инструмента оптогенетики лизосом

В.А. Алехин, С.М. Бухалович, Д.Ф. Багаева, А.Э. Михайлов, Н.С. Ильинский

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Оптогенетика органелл в настоящее время является молодым, перспективным и интенсивно развивающимся научным подходом, обещающим широкие возможности для манипуляции физиологией клеток и её исследования. В последние годы интенсивно разрабатываются инструменты оптогенетики различных органелл, например, митохондрий [1], синаптических пузырьков и лизосом [2].

Мы планируем использовать для оценки эффективности созданного коллективом нашей лаборатории оптогенетического инструмента для защелачивания лизосом lyso-Rhodopsin методику, описанную в статье [3]. В данной методике клетки окрашиваются реактивом Magic Red CT5B (ImmunoChemistry Technologies), который при расщеплении лизосомальным ферментом катепсином В (активным при низком pH) испускает красную флуоресценцию, после чего препарат инкубируется в присутствии реактива LLOMe (Метилвый эфир L-лейцил-L-лейцина), активного в кислой среде, вызывающего пермеабиллизацию мембран, с последующей отмывкой препарата от LLOMe. При воздействии LLOMe из-за пермеабиллизации мембран pH лизосом растёт; после отмывки, благодаря определённым процессам, в первую очередь действию белкового комплекса SCRT, целостность лизосомной мембраны восстанавливается, и pH падает до исходного уровня. В случае слишком долгой (более 5 минут) инкубации с LLOMe пермеабиллизация мембран становится необратимой, и восстановления pH не наблюдается.

К настоящему времени мы протестировали вышеописанную методику на своём оборудовании, показали, что обусловленная воздействием LLOMe пермеабиллизация лизосомальной мембраны вызывает выброс из лизосом в цитозоль ионов водорода (сенсор SynHer) и кальция (сенсор FGCamp7), а также подтвердили, что lyso-Rhodopsin можно использовать в эксперименте совместно с LLOMe и Magic Red. Мы предполагаем, что повышение pH лизосом клеток с помощью lyso-Rhodopsin непосредственно перед добавлением LLOMe нейтрализует, или, по крайней мере, уменьшит воздействие LLOMe на мембраны лизосом, что приведёт к уменьшению повышения pH лизосом при кратковременном воздействии LLOMe на клетки, а также к восстановлению pH лизосом после длительного воздействия LLOMe на клетки. Это послужит дополнительным подтверждением эффективности lyso-Rhodopsin как средства защелачивания лизосом.

Авторы выражают благодарность поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-03-2023-106, проект FSMG-2020-0003) в части работ по флуоресцентной микроскопии. Работы по экспрессии родопсинов в клетках млекопитающих выполнены за счёт гранта РФФИ № 21-64-00018.

Литература

1. *Tkatch T. et al.* Optogenetic control of mitochondrial metabolism and Ca²⁺ signaling by mitochondria-targeted opsins // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Т. 114. – №. 26. – с. E5167-E5176.

2. *Rost B.R. et al.* Optogenetic acidification of synaptic vesicles and lysosomes // *Nature neuroscience*. – 2015. – Т. 18. – №. 12. – с. 1845-1852.

3. *Skowyra M.L. et al.* Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair // *Science*. – 2018. – Т. 360. – №. 6384. – с. eaar5078.

УДК 577.218

Дифференциальная регуляция изоформ 201 и 202 гена ERICH3, кодирующего компонент первичной реснички, способный регулировать жизнеспособность клеток

Э.А. Богомолова, Д.Э. Демин

Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Первичная ресничка – недостаточно изученная неподвижная клеточная органелла, расположенная на поверхности клеток млекопитающих. Выступая в качестве клеточной “антенны”, она присутствует на большинстве клеток человека и является важным медиатором передачи внеклеточных сигналов, регулирующих клеточный цикл, жизнеспособность и устойчивость клеток к инсулину [1]. Белок ERICH3 известен как компонент первичной реснички, который контролирует длину реснички и передачу сигнала через нее. Повышенный уровень ERICH3 в клетках ассоциирован с более тяжелым течением колоректального рака [2]. У данного гена есть две основные изоформы: ERICH3 201 и 202, которые имеют протяженный общий участок, но сайт узнавания комплексом стимуляции анафазы D-box присутствуют только в более длинной 201 изоформе. Отсутствие сайта, который узнает данная убиквитин-лигаза, в 202 изоформе может приводить к различной динамике деградации изоформ ERICH3 в митозе [3].

Наше исследование направлено на изучение роли изоформ ERICH3. Мы показали, что экспрессия мРНК гена ERICH3 повышается при добавлении тиоридазина – антипсихотического препарата, который, согласно имеющимся в литературе и нашим собственным данным, активирует образование первичной реснички [4]. Предварительные результаты свидетельствуют о том, что тиоридазин снижает скорость роста клеток, в разной степени активирует экспрессию изучаемых изоформ мРНК ERICH3, а также влияет на экспрессию других генов, участвующих в образовании первичной реснички и в клеточной адгезии. Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что изоформы белка ERICH3 участвуют в передаче регуляторных сигналов через первичную ресничку. Дальнейшее изучение механизмов этого участия может быть полезно для понимания механизмов широкого спектра заболеваний, таких как колоректальный рак и диабет.

Литература

1. Avalos Y. et al. Palmitic acid control of ciliogenesis modulates insulin signaling in hypothalamic neurons through an autophagy-dependent mechanism // Cell Death & Disease. 2022. V. 13. P. 659.
2. Liu Z. et al. Gene Expression Profile Reveals a Prognostic Signature of Non-MSI-H/pMMR Colorectal Cancer // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2022. V. 10.
3. Demin D. E. et al. Full and D-BOX-Deficient PTTG1 Isoforms: Effects on Cell Proliferation // Molecular Biology. 2022. P. 1.
4. Bao Z., Huang W. Thioridazine promotes primary ciliogenesis in lung cancer cells through enhancing cell autophagy // Int. J. Clin. Exp. Med. 2017. V. 10. P. 13960.

УДК 571.27

Изучение регуляции транскрипции генов после активации врожденного иммунного ответа в культуре клеток S2 *Drosophila melanogaster*

М. Гасса^{1,2}, Р. В. Деев^{1,3}, Н.Г. Степанов^{1,4}, Ю.В. Шидловский^{1,4}, З.М. Качаев¹

¹ Институт биологии гена РАН

² Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, МИРЭА – Российский технологический университет

³ Дамасский университет, Дамаск, Сирия

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова

Гуморальный врожденный иммунитет в высшей степени консервативен у всех эукариот. Изучение молекулярных механизмов активации сигнальных путей IMD и Toll, являющихся составными частями гуморального иммунитета дрозофилы, представляет большой интерес. S2 клеточная линия является достаточно удобной модельной системой активации иммунитета у *D. melanogaster* [1]. Для поиска оптимальных условий активации генов иммунного ответа, запускаемых сигнальными путями IMD и Toll, мы использовали различные концентрации инактивированных культур *E. coli*, *M. luteus*, а также спор *M. anisopliae*. Нами были обнаружены достаточно высокие уровни активации классических генов AMPs, которые участвуют в антимикробной защите после обработки S2 клеток с помощью *E. coli*, *M. luteus*. Более того, мы обнаружили привлечение транскрипционного фактора Relish на промоторные области AMPs генов не только после активации IMD пути, но также после активации Toll сигнального пути. Наконец, наши данные показывают разные эффекты на активацию генов AMPs в присутствии 20-гидроксиэджизона (20HE), т.е. присутствие 20HE не всегда приводило к усилению активации иммунного

ответа, как это было показано раньше. В то же время, нам впервые удалось обнаружить относительно высокие уровни активации *AMPs* генов после обработки S2 клеток 20HE и спорами *M. anisopliae*.

Работа выполнена при поддержке гранта 23-24-00567 Российского научного фонда.

Литература

1. Harnish J.M., Link N., Yamamoto S. *Drosophila* as a Model for Infectious Diseases // *Int J Mol Sci*, 2021 22(5).

УДК 577.2

Создание панели флуоресцентных клеток для исследования действия противораковых препаратов на клеточный цикл и морфологию

М.А. Богомолов, Т.Д. Лебедев

Московский физико-технический институт

(национальный исследовательский университет)

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Ранее влияние противораковых препаратов на клеточный цикл было исследовано для отдельных препаратов на некоторых клеточных линиях, однако широкий спектр препаратов не был представлен ни в одном исследовании. Новый метод исследования клеточного цикла — репортер FUSCI-PIP позволяет решить эту проблему. Также современные методы распознавания изображений делают возможным получение большого количества морфологических параметров методами флуоресцентной микроскопии. На основе двух этих решений создана панель клеток исследования и предсказания действия противораковых препаратов.

Для создания панели были отобраны клеточные линии, представленные в таблице 1. Отбор происходил на основании тканевой принадлежности и мутационного статуса по генам, которые ассоциированы с клеточным циклом. Данные для отбора были взяты из проекта DepMap [1].

При помощи лентивирусной трансдукции в отобранные клеточные линии был внесен репортер FUSCI-PIP, который позволяет отслеживать динамику клеточного цикла на уровне отдельных клеток [2]. Данный репортер использует белки Cdt1 и Geminin, связанные с различными флуоресцентными белками, которые подвергаются протеолизу по окончании G1 и M фаз соответственно. Этот механизм позволяет точно отследить фазу клеточного цикла отдельной клетки при помощи флуоресцентной микроскопии. Для подтверждения работоспособности репортера был использован метод проточной цитофлуориметрии с окрашиванием клеточного ядра красителем SYTOX blue.

На полученной панели флуоресцентных клеток было протестировано влияние на клеточный цикл и морфологию клеток противораковых препаратов, указанных в таблице 2. Все выбранные препараты относятся к группам препаратов, способным влиять на клеточный цикл. Для численной оценки параметров клеточного цикла и морфологии клеток изображения флуоресцентной микроскопии были обработаны с использованием программ CellProfiler и Cellpose 2.0 [3,4]. Было оценено соотношение клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла, для каждой клеточной линии и каждого препарата. Также данные о морфологии клеток позволяют подобрать алгоритм для кластеризации по морфологическим параметрам.

Таблица 1. Отобранные для создания панели клеточные линии, их тканевая принадлежность и наличие мутаций по генам, ассоциированным с клеточным циклом

Линия	Тип рака	Мутационный статус
A549	Рак лёгкого	ATR
H1299	Рак лёгкого	TP53
LN-18	Глиома	TGFB3
Kelly	Нейробластома	RBL2
SHSY-5Y	Нейробластома	PLK1
786-O	Рак почки	ATM, TP53
SKOV3	Рак яичника	TP53
SIHA	Рак шейки матки	RBL2

Таблица 2. Выбранные препараты и механизмы их действия

Препарат	Группа препаратов по механизму действия
Доксорубицин	Ингибиторы репликации ДНК
Даунорубицин	
Этопозид	
Винкристин	
5-Фторурацил	
5-Азациитидин	
Панобиностат	Эпигенетические регуляторы
Белиностат	
Саракатиниб	Src ингибиторы
Дазатиниб	
THZ-1	
Палбоциклиб	Ингибиторы CDK
Алисертиб	Ингибиторы auroraA киназы

Литература

1. Tsherniak A., Vazquez F., et al. Defining a cancer dependency map // Cell. 2017. V. 27. P. 564.
2. Yano S., Tazawa H., Kagawa S., Fujiwara T., Hoffman RM. FUCCI Real-Time Cell-Cycle Imaging as a Guide for Designing Improved Cancer Therapy: A Review of Innovative Strategies to Target Quiescent Chemo-Resistant Cancer Cells // Cancers 12. 2020. V. 12. P. 2655.
3. Stirling D.R., Swain-Bowden M.J., Lucas A.M., Carpenter A.E., Cimini B.A., Goodman A. CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability // BMC Bioinformatics. 2021. V. 22. P. 433.
4. Pachitariu M., Stringer C. Cellpose 2.0: how to train your own model // Nat Methods. 2022. V. 19. P. 1634.

УДК 577.29

Создание вирусоподобных частиц с Cas12a нуклеазой для генной терапии ВИЧ-инфекции

С.Е. Боровикова^{1,2}, Н.А. Круглова¹

¹Институт биологии гена РАН

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Комбинированная антиретровирусная терапия остается основной стратегией лечения пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Однако применение антиретровирусных препаратов на протяжении всей жизни больного, их высокая стоимость и развитие устойчивости к ним требуют поиска новых стратегий для лечения ВИЧ-инфекции.

Одним из современных подходов к данной проблеме может стать генная терапия, основанная на применении системы редактирования генома CRISPR/Cas. При таком подходе CD4+ Т-клетки (основная мишень ВИЧ в организме человека) изымаются у пациентов, модифицируются *ex vivo*, а затем вводятся пациентам обратно. Нуклеаза Cas, направляемая гидовой РНК, вместе образующие рибонуклеопротеидный комплекс (РНКП), нокаутирует в геноме клетки гены *CXCR4* и *CCR5*. Данные гены кодируют необходимые для проникновения ВИЧ корецепторы, поэтому их нокаут способствует резистентности клеток к последующей инфекции ВИЧ. Способ доставки нуклеазы в клетки остается нерешенной задачей. В ряде недавно опубликованных исследований сообщалось об эффективной доставке Cas белка с помощью вирусоподобных частиц на основе ретровирусов (Virus-like particles, или VLP) [1], [2], [3]. VLP

собираются из вирусных белков (как например, белка Gag из ВИЧ), но в них отсутствует генетический материал вируса, поэтому частицы не способны вызвать вирусную инфекцию.

В этом исследовании мы сконструировали VLP, содержащие РНП с Cas12a и гидовой РНК, нацеленной на гены *CXCR4/CCR5*. Платформа для сборки VLP основана на недавно разработанной системе “NanoMEDIC” для сборки аналогичных VLP с нуклеазой Cas9 [1]. В отличие от оригинальной системы, мы заменили нуклеазу Cas9 на Cas12a. Отличительная особенность Cas12a – способность к процессингу собственной гидовой РНК. Это свойство мы хотим использовать для создания единой генетической конструкции, включающей как Cas12a, так и гидовую РНК. Мы полагаем, что выход единой мРНК, кодирующей гидовую РНК и Cas12a, в цитоплазму может увеличить количество собираемых РНП в цитоплазме и, соответственно, улучшить их упаковку в частицы.

Частицы на основе “NanoMEDIC” несут на поверхности гликопротеиновые рецепторы VSV-G, необходимые для проникновения VLP в клетки. Внутри частицы находятся белки, отвечающие одновременно за сборку частицы и привлечение Cas белков, нагруженных гидовой РНК, в VLP. Для селективного привлечения РНП в частицы используется система димеризации двух белковых доменов FRB и FKBP12 при участии агента димеризации – рапамицина. Домен FKBP12, слитый с белком сборки частиц Gag, прикреплен к мембране и привлекает домен FRB, слитый с белком Cas12a. Частицы переносят РНП Cas12a в клетки, где в последующем происходит редактирование генов-мишеней.

На первом этапе данной работы мы создали генетические конструкции, кодирующие гидовую РНК и Cas12a, и протестировали их на суспензионной Т-клеточной линии СЕМ. Плазмиды с Cas12a и гидовыми РНК, нацеленными на несколько локусов в генах *CXCR4* и *CCR5*, были доставлены в клетки методом электропорации. Уровни нокаута рецепторов в этих клетках анализировали методом проточной цитофлуориметрии. В результате серии экспериментов были выбраны две гидовые РНК для генов *CXCR4* и *CCR5* с наибольшей эффективностью редактирования генома – до 30% клеток с нокаутом. Затем мы оценили уровень редактирования с помощью конструкций, кодирующих нуклеазу Cas12a с доменом FRB, слитым с N- или C-концом Cas12a. Более эффективным вариантом оказался белок Cas12a с N-слитым FRB. Выбранные варианты конструкций в последующем были использованы для наработки VLP.

Для наработки частиц клеточную линию 293Т трансфицировали плазмидами, кодирующими гликопротеин VSV-G, Gag-FKBP12, FRB-Cas12a и гидовую РНК. В тот же день в среду добавляли аналог рапамицина – AP21967 (TakaraBio), необходимый для привлечения Cas12a в VLP. Культуральный супернатант, содержащий VLP, концентрировали с помощью ультрацентрифугирования. Полученные VLP анализировали методом вестерн-блоттинга на наличие Cas12a. Для последующей трансдукции в качестве клеток-мишеней были выбраны два типа клеток: клон 293Т/CD4/CCR5 для редактирования гена *CCR5* и культура СЕМ для редактирования гена *CXCR4*.

В заключении, мы создали конструкции для экспрессии гидовых РНК против генов *CXCR4/CCR5* и нуклеазы Cas12a для производства VLP на основе ранее опубликованной системы “NanoMEDIC”. Следующими шагами в исследовании будут трансдукция полученными VLP клеток и оценка эффективности редактирования генов-мишеней.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-15-00381.

Литература

1. *Gee P. et al.* Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nat Commun.* 2020 Mar 13;11(1):1334.
2. *Hamilton J.R. et al.* Targeted delivery of CRISPR-Cas9 and transgenes enables complex immune cell engineering. *Cell Rep.* 2021;35(9):109207.
3. *Mangeot P.E. et al.* Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Nat Commun.* 2019 Jan 3;10(1):45.

УДК 616.006

Исследование миграционной активности радиорезистентных субпопуляций клеточных линий немелкоклеточного рака легкого человека, А549 и H1299

Ф.А. Малахов, Л. Алхаддад, Е.Г. Контарев, С. В. Леонов, М.В. Пустовалов

¹Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

Рак легкого – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований, 85% случаев которого приходится на немелкоклеточный рак (НМРЛ). Лучевая терапия является одним из основных методов лечения пациентов с НМРЛ. Однако устойчивость опухолевых клеток к воздействию

остаётся основным фактором, ограничивающим успешный терапевтический исход. Метастазирование является основной причиной смерти от рака, следовательно, профилактика и лечение метастазов имеют основополагающее значение для улучшения клинических результатов лечения пациентов с онкозаболеваниями. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) придает раковым клеткам метастатические свойства за счет повышения подвижности, инвазии и устойчивости к апоптотическим стимулам. Кроме того, опухолевые клетки, подвергающиеся процессу ЭМП, приобретают свойства стволовых клеток и проявляют выраженную терапевтическую устойчивость. Целью данной работы являлось изучение миграционной активности радиорезистентных субпопуляций клеточных линий НМРЛ, различающихся по статусу белка p53, А549 (p53 дикого типа) и Н1299 (p53 дефицитные).

В ходе работы были получены радиорезистентные субпопуляции клеток линий А549IR и Н1299IR путем фракционированного воздействия рентгеновского излучения в суммарной дозе 60 Гр, имитировавшим стандартную радиотерапию. Для подтверждения радиорезистентности выживших после облучения клеточных линий был проведен клоногенный тест, являющийся «золотым стандартом» оценки клеточной радиочувствительности. На рисунке 1 показаны кривые выживаемости клеточных линий А549IR и Н1299IR по сравнению с родительскими линиями А549 и Н1299. Полученные результаты свидетельствуют о том, что выжившие после лучевой терапии клетки обладают меньшей радиочувствительностью.

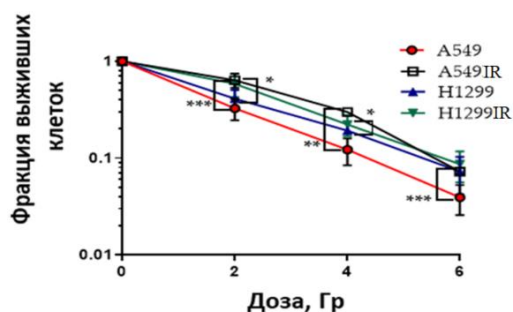


Рисунок 1. Кривые выживаемости родительских и выживших после лучевой терапии клеток НМРЛ. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Снижение маркера эпителиальных клеток, Е-кадгерина, и сопутствующее увеличение маркеров мезенхимальных клеток, N-кадгерина и виментина, являются условными индикаторами активации ЭМП в клетках. В связи с этим мы провели анализ экспрессии Е-кадгерина, N-кадгерина и виментина в родительских клетках НМРЛ и их радиорезистентных сублиниях (рис.2). Воздействие лучевой терапии вызывало значительное снижение экспрессии Е-кадгерина и виментина в клетках А549IR и в то же время, приводило к значительному увеличению экспрессии N-кадгерина. Клетки Н1299 эндогенно не экспрессируют Е-кадгерин. В то же время, значимого изменения экспрессии N-кадгерина и виментина в этих клетках не наблюдалось. Полученные результаты свидетельствуют о частичной активации ЭМП в выживших после лучевой терапии клетках НМРЛ [1].

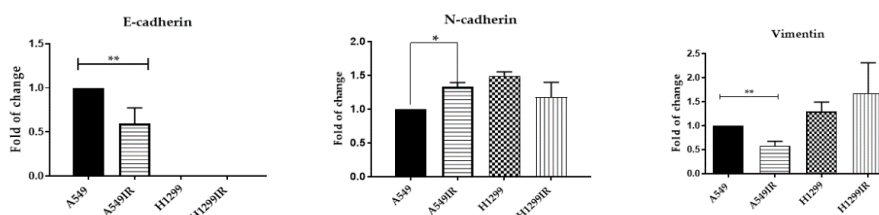


Рисунок 2. Экспрессия маркеров эпителиально-мезенхимального перехода. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Известно, что компоненты цитоскелета (в частности, актиновая сеть), используемые метастатическими клетками для процесса инвазии, аналогичны участию актинового цитоскелета в процессе эндоцитоза. Поэтому на следующем этапе мы проанализировали связь между фенотипом ЭМП, механобиологией клеточного метастазирования и эффективностью эндоцитоза исходными и выжившими после воздействия ИИ клетками НМРЛ. Была оценена способность исходных (А549 и Н1299) и выживших после облучения (радиорезистентных) клеток (А549IR и Н1299IR) инкапсулировать карбоксилат-модифицированные флуоресцентные частицы размером 100 нм (рис. 3). Сравнительный анализ количества частиц во фракциях высоко- и низко-инвазивных клеток НМРЛ оценивался по степени их колоколизации с использованием коэффициента корреляции Пирсона. Анализ полученных коэффициентов показал, что ИИ вызывает увеличение способности к интернализации частиц радиорезистентными сублиниями с p53 дикого типа (А549IR) по сравнению с родительскими А549 клетками практически в 2 раза ($r=0,35$ и $r=0,17$, соответственно). В то же время коэффициент перекрытия

Пирсона в дефицитных по p53 H1299IR сублиниях ($r=0,29$) снижался в 1,8 раз по сравнению с H1299 клетками ($r=0,16$).

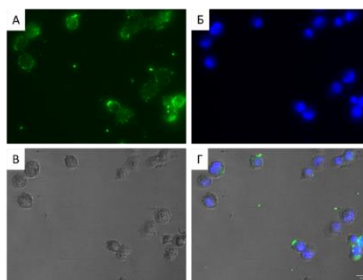


Рисунок 3. Типичные изображения интернализированных и присоединенных флуоресцентных 100 нм наночастиц клетками НМРЛ. Флуоресцентные частицы на поверхности и внутри клеток (зеленый) (А). Ядра клеток, окрашенные DAPI (синий) (Б). Визуализация клеток в проходящем свете (В). Колоколизация ядер и интернализированных частиц (Г). Масштабная линейка составляет 25 мкм.

Подтверждение миграционной активности родительских и радиорезистентных клеточных линий НМРЛ оценивалось по способности высоко-инвазивных клеток проходить через 8 мкм поры мембран камеры Бойдена. Полученные результаты свидетельствуют о том, что миграционная активность радиорезистентных линий возросла примерно в 2 раза по сравнению с родительскими линиями (таблица 1). Так для линий H1299IR, H1299, A549IR, A549 доля клеток, прошедших через мембрану камеры Бойдена составила 53,3%, 39,6%, 60,7% и 36,8% соответственно.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о приобретенной в ходе лучевой терапии устойчивости клеток НМРЛ к облучению и приобретением свойств ЭМП с последующей миграционной и инвазивной активностью.

Работа выполнена при поддержке программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

Литература

1. Pustovalova M. [et al.] Transcriptome-Based Traits of Radioresistant Sublines of Non-Small Cell Lung Cancer Cells // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 3042.

УДК 576.37

Нарушение сперматогенеза у самцов мышей C57BL/6 с одновременным нокаутом CDK8 и CDK19

Н.И. Ставская¹, Е.А. Варламова¹, М.В. Уткина², В.П. Богданов², З.Г. Антышева², В.В. Татарский¹, А.В. Брутер¹

¹Институт биологии гена Российской академии наук

²ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России

CDK8 и CDK19 - циклин-зависимые киназы, однако они не участвуют напрямую в смене фаз клеточного цикла, а выступают в качестве регуляторов транскрипции. CDK8 и CDK19 принимают участие в регуляции транскрипции в качестве субъединиц киназного модуля медиаторного комплекса, но, кроме того, играют роль в передаче сигналов, фосфорилируя транскрипционные факторы таких сигнальных каскадов, как NOTCH и Jak-STAT. CDK8 и CDK19 – паралоги, взаимозаменяемые в некоторых контекстах у позвоночных. Конститутивный нокаут CDK8 летален на эмбриональной стадии, а индуцированный условный нокаут во взрослом возрасте по литературным данным не имеет выраженного фенотипа. Нокаут CDK19 полностью асимптоматичен. Мы предположили, что для появления фенотипа во взрослом возрасте необходим одновременный нокаут CDK8 и CDK19 [1].

В качестве объекта исследования выступали двойные трансгенные мыши CDK8^{fl/fl}/Rosa26-Cre-ER^{T2} и тройные трансгенные мыши CDK8^{fl/fl}/CDK19^{-/-}/Rosa26-Cre-ER^{T2} на бэкграунде C57BL/6. Они были получены в ходе серии скрещиваний из линии CDK8^{fl/fl} (с фланкированным LoxP-сайтами вторым экзonom гена *Cdk8*), линии CDK19^{-/-} (с нокаутом гена *Cdk19*) и линии Rosa26-Cre-ER^{T2}, экспрессирующей генетически модифицированную рекомбиназу Cre, активную только в присутствии гидрокситамоксифена. Для индукции нокаута CDK8 (вырезания экзона 2) мышам в возрасте 8 недель интраперитонеально вводили тамоксифен 7 дней в количестве 3 мг/сут [2].

После активации у мышей с двойным нокаутом был обнаружен выраженный фенотип: сторбленность, характерный прищур глаз, жирная шерсть, склонность собираться в кучу, снижение реакции на внешние раздражители и подвижности.

В эксперименте по определению продолжительности жизни мы сравнили тройных трансгенов с активацией тамоксифеном (13 особей) и без (10 особей). Мы обнаружили, что продолжительность жизни

животных с двойным нокаутом значительно сокращена по сравнению с контрольной группой. При этом продолжительность жизни нокаутных самцов сократилась более значительно, чем продолжительность жизни нокаутных самок.

В эксперименте по определению фертильности мы обнаружили, что самцы $CDK8^{-/-}$ утратили половое поведение в значительной мере и не оставили потомства, несмотря на нормальный внешний вид и поведение, а самцы с двойным нокаутом полностью утратили половое поведение и так же не оставили потомства. При этом самцы с нокаутом $CDK19$ сохранили половое поведение, хотя и оставили меньше потомства, чем самцы из группы $C57BL/6$, получавшие тамоксифен.

В ходе патологоанатомического исследования мышей $CDK8^{-/-}/CDK19^{-/-}$ было обнаружено, что у двойного нокаута семенники и диаметр тестикулярных канальцев меньше, чем у контрольных групп $CDK8^{-/-}$ и получавших тамоксифен $C57BL/6$ (рис. 1).

При окрашивании семенников гематоксилин-эозином было выяснено, что эпителий семенных канальцев у $CDK19^{-/-}/CDK8^{-/-}$ представлен клетками Сертоли, сперматогониями и сперматоцитами 1 порядка, тогда как клетки следующих стадий сперматогенеза отсутствуют. Также замечены клетки с колхициноподобными структурами, наблюдаемыми обычно при митотической катастрофе, и апоптотические тельца. Клетки Лейдига были меньшего размера. Более того, были обнаружены признаки потери контакта между клетками Сертоли и сперматогенными клетками. Каналы придатка также не содержали сперматозоидов. В группах $CDK8^{-/-}$ и $C57BL/6$ изменения не зафиксированы.

С помощью проточной цитофлуориметрии было обнаружено, что в семенниках мышей $CDK8/19^{-/-}$ есть $4n$ популяции первичных сперматоцитов, сперматогоний и соматических клеток в S-фазе, но уменьшается количество $2n$ клеток и почти отсутствуют $1n$ популяции сперматид. Также у двойного нокаута увеличивается количество клеток в апоптозе. Нокауты $CDK8^{-/-}$ или $CDK19^{-/-}$ имеют такое же распределение клеток, как и $C57BL/6$ после тамоксифена. Таким образом, сперматогонии у самцов $CDK19^{-/-}/CDK8^{-/-}$ успешно вступают в мейоз, однако не доходят до стадии сперматид (рис. 2).

В результате иммунофлуоресцентного окрашивания SCP3 (белок синаптонемального комплекса) семенных канальцев было выявлено, что у двойных нокаутов почти все клетки, кроме сперматогоний и клеток Сертоли в базальном компартменте, представлены SCP3+ клетками, однако специфичные для кроссинговера паттерны не были обнаружены, тогда как в канальцах дикого типа клетки SCP3+ были только в базальном компартменте, и в некоторых канальцах были отмечены паттерны, специфичные для пахитены. Это указывает на то, что клетки $CDK8/19^{-/-}$ вступают в мейоз, но не могут пройти профазу мейоза I, так как не способны собрать синаптонемный комплекс и выполнить кроссинговер. Сперматоциты 1 порядка задерживаются в зиготене и погибают.

С помощью РНК-секвенирования одиночных клеток было выявлено, что в клетках Лейдига у нокаутов $CDK19/8^{-/-}$ значительно меньше стали экспрессироваться гены, связанные с липидным обменом и биосинтезом стероидов, необходимых для нормального сперматогенеза (*Cyp17a1*, *Lcn2*, *Fads2*, *Star*, *Sc5d*, *Pld3*, *ApoC1*). Некоторые из них фенотипически проявляются мужским бесплодием.

Было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание препарата семенника на *Cyp17a1*, результаты которого подтвердили отсутствие данного белка в клетках Лейдига. В результате измерения гормонов в крови был отмечен пониженный уровень тестостерона у мышей с нокаутом $CDK8$ и $CDK8/19$.

Мы обнаружили характерный фенотип у мышей обоих полов с одновременным нокаутом $CDK8$ и $CDK19$, который выражается в нарушении поведения и сокращении продолжительности жизни. Также мы выяснили, что самцы с нокаутом $CDK8$ бесплодны ввиду поведенческих нарушений, а самцы с одновременным нокаутом $CDK8$ и $CDK19$ бесплодны из-за отсутствия сексуального поведения и серьезной недостаточности сперматогенеза. Сперматогонии $CDK8/19^{-/-}$ успешно вступают в мейоз, но не могут продвинуться дальше зиготены, не образуют синаптонемный комплекс, не выполняют кроссинговер в пахитене и уходят в апоптоз. Мыши $CDK8^{-/-}/CDK19^{-/-}$ отличаются сниженной экспрессией ряда генов, участвующих в биосинтезе стероидов, необходимых для нормального сперматогенеза. У самцов с двойным нокаутом нарушена гормональная регуляция, а именно низкий уровень тестостерона.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-15-00227.



Рисунок 1. Репродуктивная система самцов мышей $C57BL/6$ (слева) и $CDK8/19^{-/-}$ (справа)

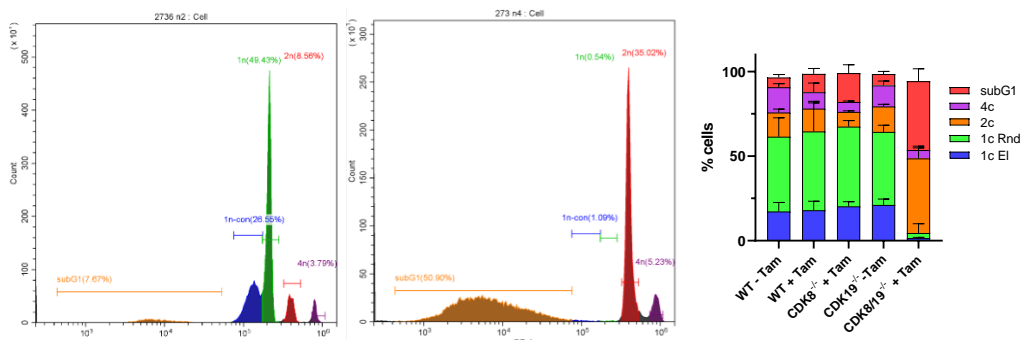


Рисунок 2. Гистограммы проточной цитометрии окрашенных PI клеток семенников мышей C57BL/6 tam+ (слева) и CDK8/19^{-/-} (в центре): subG1 – апоптотические клетки, 1n-con – длинные сперматиды, 1n – круглые сперматиды, 2n – соматические клетки, сперматогонии и вторичные сперматоциты, 4n – первичные сперматоциты; сперматогонии и соматические клетки в S-фазе. Сравнение количества клеточных популяций семенников мышей (справа).

Литература:

1. Ставская Н.И., Ильчук Л.А., Окулова Ю.Д. и др. Трансгенные мыши для изучения киназа-независимых механизмов действия циклин-зависимых киназ CDK8/19 // Вестник РГМУ. 2022. №6.
2. Ilchuk L.A., Stavskaya N.I., Varlamova E.A. et al. Limitations of Tamoxifen Application for In Vivo Genome Editing Using Cre/ER(T2) System // Int J Mol Sci. – 2022. – Т. 23, № 22.

УДК 57.088

Колокализация белков в рецепторных комплексах с использованием нанометок

П.А. Тин¹, А.К. Крючкова¹, А.С. Минин², И.В. Зубарев¹

¹Московский физико-технический институт, Москва

²Институт физики металлов Уральского отделения РАН, Екатеринбург

Информация о колокализации белков в рецепторных комплексах играет огромную роль для определения мишеней при диагностике и лечении орфанных заболеваний. Световая микроскопия не позволяет точно показать расположение и взаимодействия нескольких белков в одном рецепторном комплексе в мембране клетки. Для визуализации с молекулярным разрешением применяют технологию иммуномечения золотом, основанную на использовании нанометок – наночастиц золота, сшитых с антителами к исследуемым белкам [1]. Однако недостаток этой технологии – неспособность показать всех возможных участников в рецепторном комплексе из-за использования только одного вида наночастиц. К тому же при мечении серийных срезов теряется пространственная связь и нет возможности колокализировать белки.

Целью данной работы является разработка технологии для визуализации взаимодействий белков в белковых комплексах за счет маркировки нанометками нескольких металлов: золота, серебра, железа, никеля и платины. Такая технология позволит продемонстрировать *in situ* взаимодействия белков. Функциональные тесты помогут показать наличие функциональной связи между этими белками. Для полученных наночастиц мы отработываем протоколы сшивки с антителами, проводим контроль качества наночастиц и иммуномечения. Определены оптимальные условия химической сшивки наночастиц с антителами к бычьему сывороточному альбумину (БСА) с использованием бумажной иммунохроматографии (рис. 1) и электрофореза (рис.2). Изображения нанометок получаем на просвечивающем электронном микроскопе, имеющем разрешающую способность 10 нм (рис.3). Для работы на нем подготавливаем ультратонкие (70 нм) срезы сфероидов мезенхимальных стволовых клеток человека, а также улучшаем протоколы контрастирования таких срезов. Анализ наночастиц металлов в образцах будет произведен на энергодисперсионном спектрометре для определения химического состава наночастицы.

Данная технология позволит визуализировать белковый состав клеточных рецепторов и комплексов в норме и патологии, что критически важно при таргетном лечении заболеваний, вызванных нарушениями в сборке белковых комплексов и клеточном сигналинге.



Рисунок 1. Варьирование параметров шивки для наночастиц Ni, концентрация 2 мг/мл. Красным обведено место взаимодействия нанометки с антигеном, БСА.

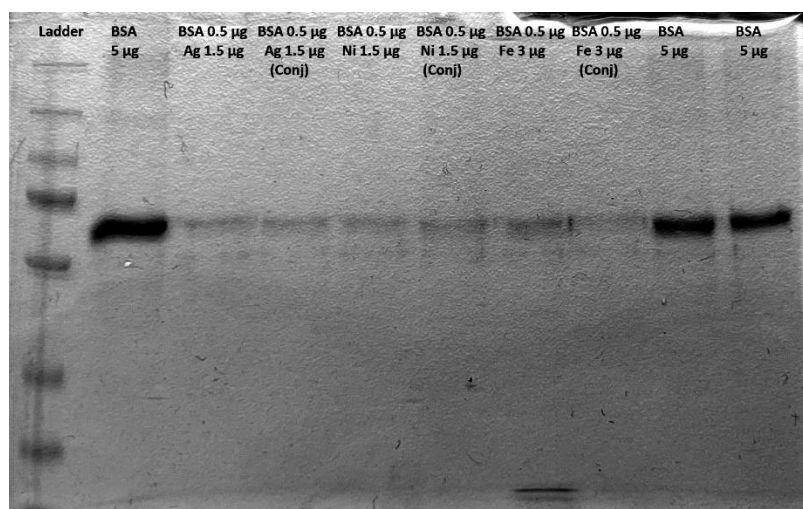


Рисунок 2. Электрофорез БСА и нанометок в полиакриламидном геле.

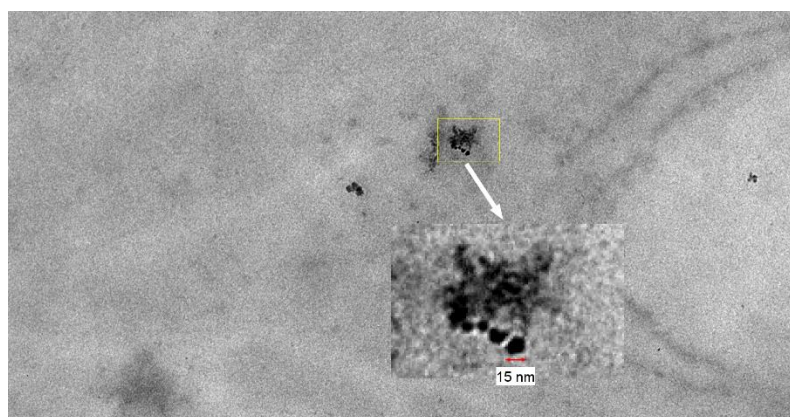


Рисунок 3. Наночастицы Fe, радиус 10-15 нм.

Литература

1. Petralia R.S., Wang Y-X Review of Post-embedding Immunogold Methods for the Study of Neuronal Structures // Front. Neuroanat. – 2021

УДК 576.08

Разработка технологии магнитоуправляемой перестройки цитоскелета

А.А. Латыпова¹, О.Ю. Каравашкова¹, А.С. Минин², И.В. Зубарев¹

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

² Институт физики металлов имени М.Н. Михеева Уральского отделения РАН

В данной работе разрабатывается технология механического воздействия на компоненты цитоскелета клетки с помощью модифицированных магнитных наночастиц. Перестройки цитоскелета очень динамичны и сопровождаются различными физиологическими и патологическими процессами. Деление, миграция, формирование межклеточных контактов - все эти процессы определяются свойствами цитоскелета [1]. Разрабатываемая технология позволяет специфично перестраивать компоненты клетки во внешнем магнитном поле, активируя различные пути клеточного сигналинга. Изучение сигналинга, ассоциированного с цитоскелетом, важно для терапии патологий, в которых задействованы изменения состояния цитоскелета - фиброза и раковых заболеваний [2, 3, 4, 5].

Химически синтезированные наночастицы не обладают способностью специфически связываться с определенными компонентами клетки - они приобретают ее за счет модификации антителами. Среди способов модификации в работе рассмотрены два основных: карбодиимидная сшивка и связывание за счёт электростатических сил. Было показано, что аффинность антител сохраняется как с химической сшивкой, так и в результате физического “прилипания” антител к наночастицам.

Для обхождения эндосомального пути поглощения наночастиц и, соответственно, сохранения аффинности антител используется магнитная система с вертикальным полем, которая ускоренно протаскивает магнитные наночастицы в клетку. Для определения оптимального времени инкубации клеток на магнитной системе измерялось время релаксации раствора наночастиц в питательной среде над слоем клеток. Время релаксации коррелирует с концентрацией частиц в растворе, что и позволяет через последовательный забор проб определить оптимальное время инкубации, за которое достигается лучшее поглощение наночастиц клетками. Также на основании релаксометрических данных показана динамика вхождения наночастиц в клетки.

Перестройки цитоскелета осуществляются в боковом магнитном поле вдоль чашки Петри - такие перестройки наблюдаются в микроскоп. При движении магнитных наночастиц (рис. 1), связанные с ними филаменты цитоскелета, перестраиваются вдоль линий магнитного поля. Результаты перестроек получены для линии клеток Emerald, обладающей флуоресцентными виментиновыми филаментами (рис. 2). Помимо вытягивания цитоскелета вдоль линий магнитного поля наблюдается увеличение скорости миграции клеток. Миграция фиксируется по перемещению клеток на предварительно освобожденный участок дна чашки Петри. В работе с живыми клетками необходимо принимать во внимание вязкость цитоплазмы и упругость клеточной мембраны, затрудняющие перестройку филаментов цитоскелета. Полученные данные на живых клетках были слабо воспроизводимы, и было решено провести эксперименты на лизированных и пермеабелизованных клетках. В работе предварительно показана возможность механических перестроек цитоскелета в магнитном поле.

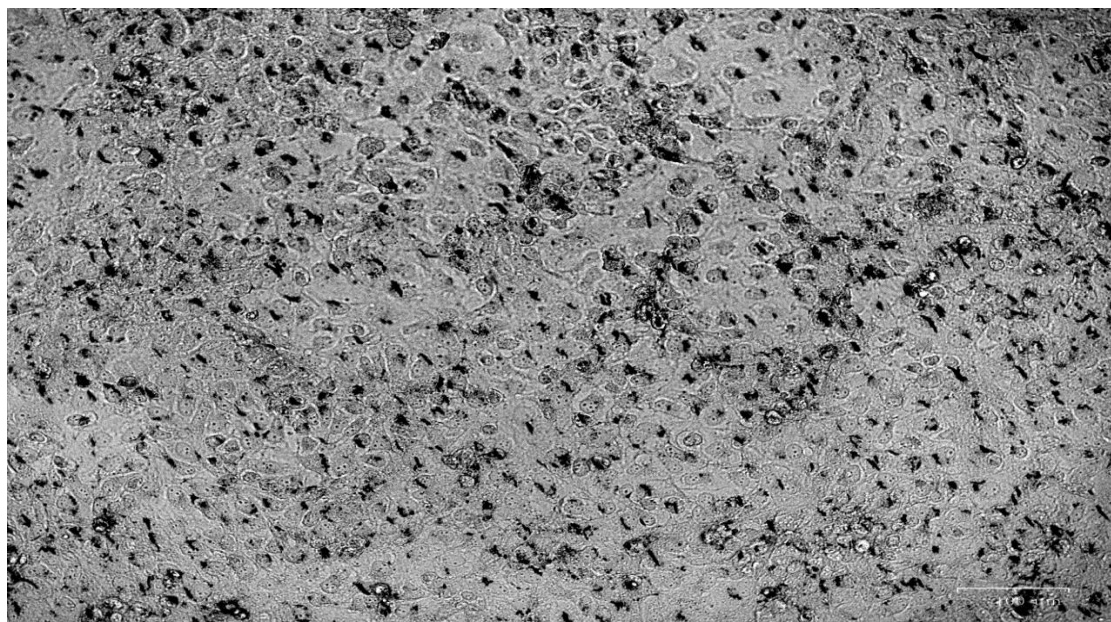


Рисунок 1. Световая микроскопия монослоя клеток с магнитными наночастицами в цитоплазме, выстроившимися по линиям магнитного поля.

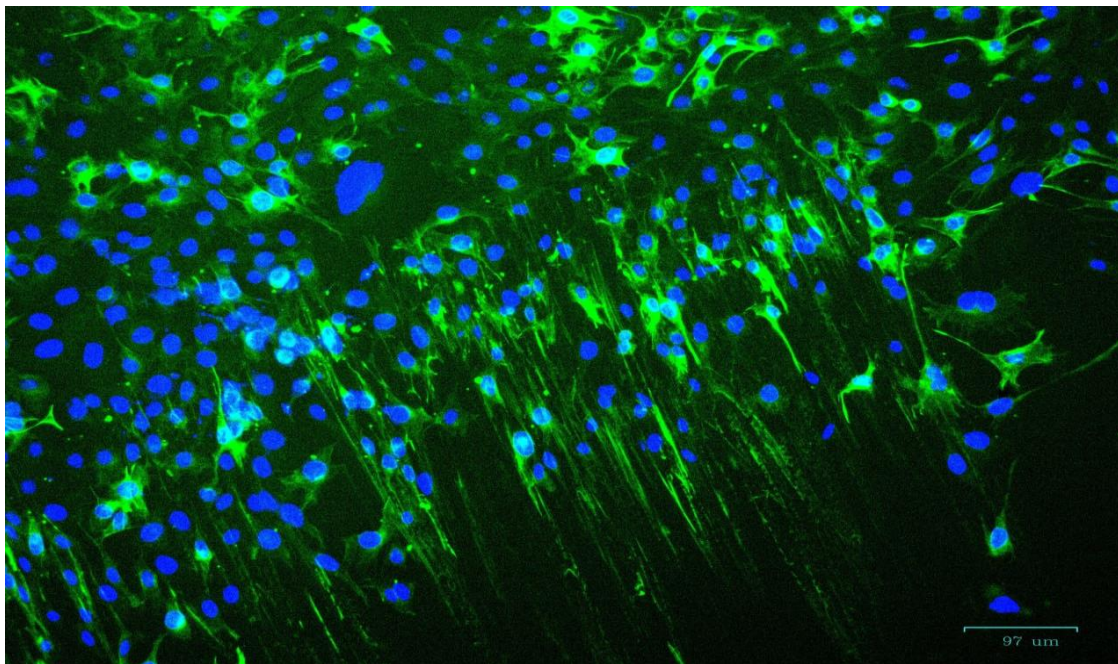


Рисунок 2. Флуоресцентная микроскопия. Снимок клеток линии Emerald с наночастицами, сшитыми с антителами к виментину, при воздействии постоянного магнита в правом нижнем углу. Наблюдается выстраивание промежуточных филаментов виментина (зеленые) вдоль линий магнитного поля.

Представленное исследование финансируется грантом Российского научного фонда № 22-74-10041.

Литература

1. Dogterom M., Koenderink G.H. Actin–microtubule crosstalk in cell biology //Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2019. – Т. 20. – №. 1. – С. 38-54.
2. Hall A. The cytoskeleton and cancer //Cancer and Metastasis Reviews. – 2009. – Т. 28. – С. 5-14.
3. Ivanov A.I. et al. Novel functions of the septin cytoskeleton: shaping up tissue inflammation and fibrosis //The American Journal of Pathology. – 2021. – Т. 191. – №. 1. – С. 40-51.
4. Parrish A.R. The cytoskeleton as a novel target for treatment of renal fibrosis //Pharmacology & therapeutics. – 2016. – Т. 166. – С. 1-8.
5. Ni J. et al. The role of RhoA and cytoskeleton in myofibroblast transformation in hyperoxic lung fibrosis //Free Radical Biology and Medicine. – 2013. – Т. 61. – С. 26-39.

УДК 2788.578

Создание онколитического вирусного штамма Коксаки Б5, адаптированного к проникновению в клетки через альтернативный рецептор, с помощью метода биоселекции

Я.Д. Гуменная^{1,2}, П.О. Воробьев², А.В. Липатова²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

Вирусная терапия – один из перспективных подходов для лечения онкологических заболеваний, в основе которого лежит применение штаммов, эффективно реплицирующихся в опухолевых клетках и не повреждающих нормальные ткани. Такая селективность связана с увеличенной эффективностью трансляции в опухолевых клетках, нарушенными системами индукции интерферона и интерфероновому ответа [1], а также отсутствием архитектуры в опухолевой ткани [2]. Разные опухоли могут сильно отличаться по чувствительности к конкретному вирусному штамму, и для персонализированного подбора наиболее эффективного вирусного препарата требуется наличие большого количества вирусных штаммов, различающихся механизмами проникновения в клетки и рецепторами, которые они используют. Нейтрализующие антитела, являющиеся основным препятствием для эффективной доставки онколитических вирусов при системном введении, аффинны, в первую очередь, к участку капсида, связывающегося с рецептором [3]. Получение вирусного штамма, обладающего высоким онколитическим потенциалом [4-6] и не подверженного нейтрализации со стороны иммунной системы организма, является актуальной задачей.

В данной работе рассматривается онколитический штамм вируса Коксаки Б5 (Живая энтеровирусная вакцина 14, ЖЭВ14), проникающий в клетки с помощью Коксаки и аденовирусного

рецептора (CXADR) и фактора ускорения распада комплемента (Complement decay-accelerating factor - CD55, DAF) в качестве корецептора [7].

В рамках нашего исследования была проведена направленная биоселекция ЖЭВ14 на клеточной культуре HEK293T-ΔCXADR-ΔIFNAR1 с использованием противовирусных препаратов - аналогов нуклеозидов, которые усиливают пластичность генома и ускоряют вирусную адаптацию путём встраивания в энтеровирусную РНК [8]. Примененные мутагены – рибавирин и хлор-диметоксифениладенин (соединение №353 из коллекции нуклеозидных аналогов) – были подобраны с помощью предварительных тестирований панели непатогенных энтеровирусов на чувствительной клеточной линии HEK293T-ΔIFNAR1 (рис. 1). Было выявлено, что ЖЭВ14 ингибируется обоими противовирусными препаратами в субтоксичных концентрациях.

Для проведения биоселекции с целью изменения используемого ЖЭВ14 рецептора с помощью системы CRISPR/Cas9 были получены моноклональные клеточные сублинии с делецией гена CXADR, затем проводилась оценка их чувствительности к различным онколитическим вирусам (рис.2).

Путем культивации на нок-аутных клеточных сублиниях мы получили адаптированный вирус, не использующий CXADR при проникновении в клетки, клонировали его трижды методом конечных разведений, затем с помощью NGS-секвенирования определили первичную структуру вирусного генома и картировали возникшие в ходе биоселекции замены.

В крысах линии Wistar были получены нейтрализующие антитела к ЖЭВ14 и его адаптированному варианту. В экспериментах с проведением микрореакции нейтрализации наблюдалась неполная кросс-активность антител (рис. 3). Полученные результаты подталкивают нас к потенциальной возможности использования адаптированного вируса в составе двухкомпонентной виротерапии опухолей. Методом обратной генетики планируется получение штамма с модифицированными капсидными белками (p1), сохраняющего свой исходный онколитический потенциал.

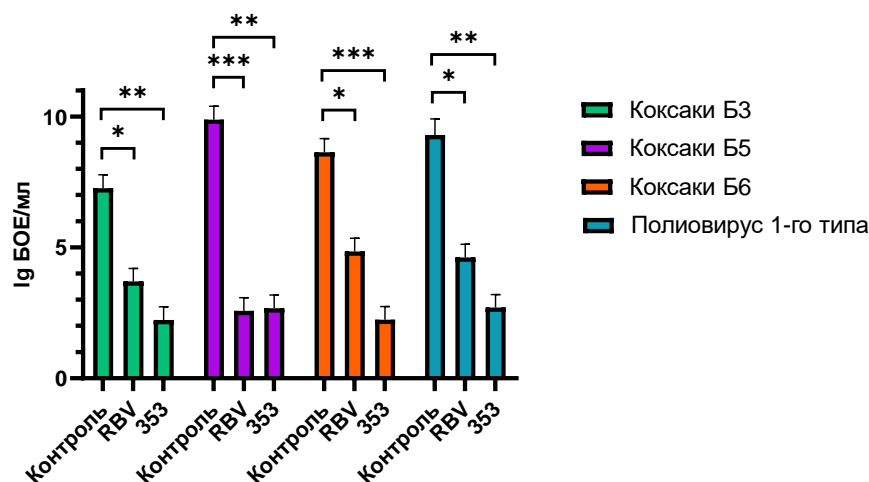


Рисунок 1. Оценка эффективности ингибирования репродукции вирусов Коксаки Б3, Б5, Б6 и Полиовируса 1-го типа нуклеозидными аналогами на клеточной линии HEK293T-ΔIFNAR1, определенная через 48 часов после инфицирования. RBV – рибавирин, 353 – хлор-диметоксифениладенин.

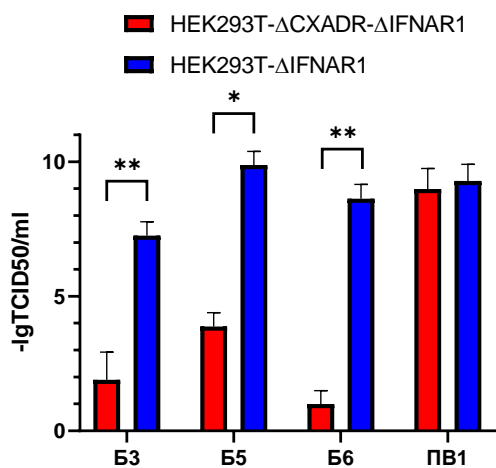


Рисунок 2. Чувствительность клона клеточной сублинии HEK293T-ΔCXADR-ΔIFNAR1 и линии HEK293T-ΔIFNAR1 к вирусам Коксаки Б3, Б5, Б6 и Полиовирусу 1-го типа, определенная через 24 часа после инфицирования.

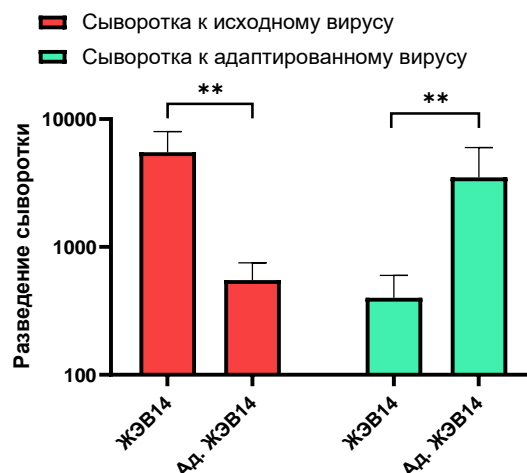


Рисунок 3. Результаты тестов нейтрализации вирусов полученными антисыворотками.

Литература

1. Matveeva O.V., et al., Mechanisms of Oncolysis by Paramyxovirus Sendai. Acta Naturae, 2015. 7(2): p. 6-16.
2. Hagios C., Lochter A. and Bissell M.J., Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1998. 353(1370): p. 857-70.
3. Niemann J., et al., Molecular retargeting of antibodies converts immune defense against oncolytic viruses into cancer immunotherapy. Nat Commun, 2019. 10(1): p. 3236.
4. Chumakov P.M., et al., [Oncolytic enteroviruses]. Mol Biol (Mosk), 2012. 46(5): p. 712-25.
5. Lipatova A.V., et al., Relationship between Cell Receptors and Tumor Cell Sensitivity to Oncolytic Enteroviruses. Bull Exp Biol Med, 2018. 166(1): p. 58-62.
6. Vorobyev P.O., et al., Oncolytic Viruses in the Therapy of Lymphoproliferative Diseases. Mol Biol, 2022. 56(5): p. 684-695.
7. Jimenez-Clavero M.A., et al., More recent swine vesicular disease virus isolates retain binding to coxsackie-adenovirus receptor, but have lost the ability to bind human decay-accelerating factor (CD55). J Gen Virol, 2005. 86(Pt 5): p. 1369-1377.
8. Crotty S., et al., The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. Nat Med, 2000. 6(12): p. 1375-9.

УДК 578

Получение иммунотерапевтического рекомбинантного штамма вируса осповакцины, экспрессирующего бета-субъединицу бактериального флагеллина *Vibrio Vulnificus*

Е.А. Емельянов^{1,2}, Я. Шакиба^{1,2}, П.О. Воробьев², А.В. Липатова²

¹Московский физико-технический институт

(национальный исследовательский университет)

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Онколитические вирусы (ОВ) демонстрируют хорошие противоопухолевые эффекты для терапии многих видов солидных новообразований [1]. Важнейшей характеристикой онколитических вирусов является их онкоселективность, которая заключается в способности избирательно лизировать опухолевые клетки за счет эффективной репликации в них. ОВ активно борются с иммуносупрессивным микроокружением в опухоли, усиливая врожденный и адаптивный иммунитет [2], формируя системный противоопухолевый иммунный ответ.

В нашей работе для повышения, иммунитет-опосредованного онколитического действия, был получен рекомбинантный штамм вируса осповакцины (LIVP), экспрессирующий бета-субъединицу бактериального флагеллина (FlaB) *Vibrio Vulnificus*. FlaB хорошо зарекомендовал себя в качестве адьюванта [3]. Флагеллины являются лигандами для толл-подобного рецептора-5 (TLR-5). Было показано, что активация TLR-5 способствует некрозу опухолевых клеток и стимулирует противоопухолевый иммунитет [4, 5]. Последовательность, кодирующая FlaB, была оптимизирована с учетом репертуара использования кодонов клетками млекопитающих с целью увеличения эффективности синтеза и сохранности функционально активной укладки белка.

Литическую активность рекомбинантного штамма исследовали на следующих мышинных клеточных моделях: СТ26 (карцинома толстой кишки), 4Т1 (аденокарцинома молочной железы), В16 (злокачественная меланома) и RAW264.7 (иммортиализованные макрофаги) (рис.1). Затем путем кокультивации RAW264.7 с культурами опухолевых клеток (В16, СТ26 и 4Т1), предварительно инфицированными LIVP-RFP или LIVP-FlaB-RFP с различной множественностью инфекции, оценивали эффективность индукции цитолитической активности макрофагов. Жизнеспособность клеток оценивали через 48 часов совместной инкубации с помощью МТТ-теста и окрашивания аламаровым синим (резазурином). LIVP-FlaB-RFP эффективно лизирует злокачественную меланому В16, и цитолитический эффект был значительно больше при совместном культивировании клеток, инфицированных LIVP-FlaB-RFP с макрофагами (рис.2). Также путем культивирования на подложке из 1,5% раствора агарозы была получена и использована для оценки цитолитической активности модель клеточных сфероидов линии В16. Вирус эффективно лизирует опухолевые клетки как в 2D так и в 3D модели.

Также был разработан протокол наработки и очистки FlaB в трансформированных компетентных бактериях *E. coli* штамм *Rosetta*. Последовательность FlaB с гистидиновой меткой была клонирована в вектор рЕТ-42b. Затем проведена оптимизация температуры инкубации и времени наращивания биомассы: культивация бактерий проводилась при 25°C в течение 4 часов после добавления 1мМ IPTG. Протокол позволяет получить наибольший выход целевого белка – мономерного растворимого FlaB. В дальнейшем FlaB очищался на Ni-NTA агарозе (рис.3).

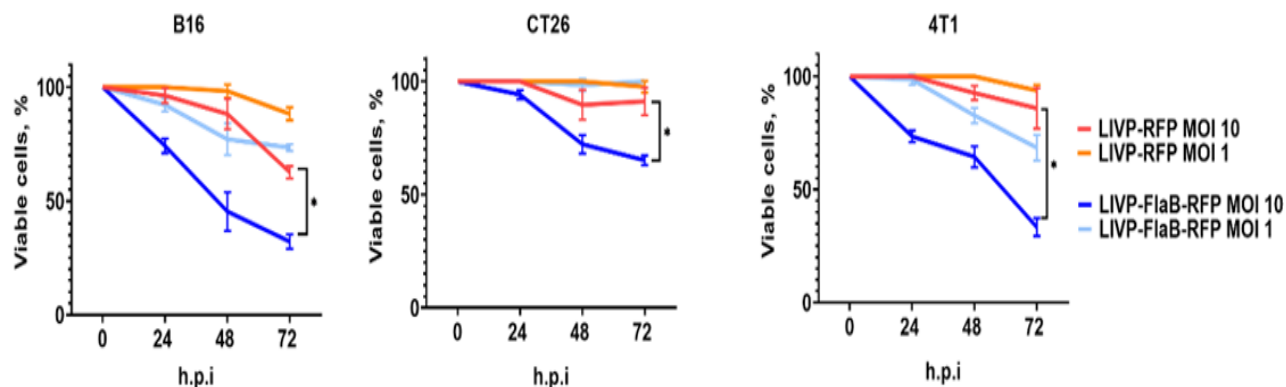


Рисунок 1. Цитолитическая активность вируса в различные временные интервалы после заражения, оценка жизнеспособности проводилась путем проведения МТТ-теста. Для статистического анализа был выполнен ANOVA тест: * $p < 0,05$.

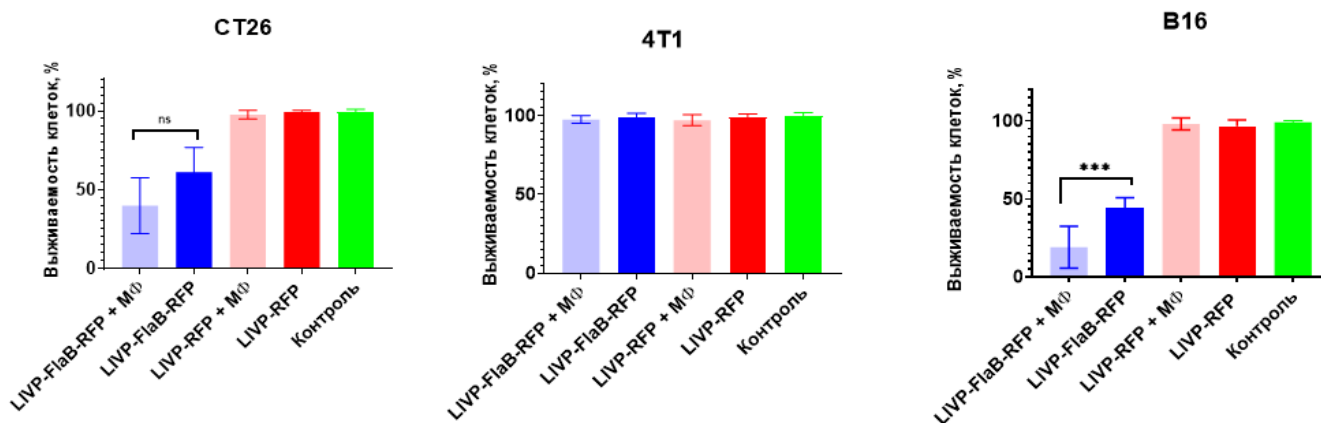


Рисунок 2. Количественная оценка жизнеспособности клеток с помощью анализа МТТ через 48 часов после инфицирования при совместном культивировании, нормализована по отношению к неинфицированному контролю. Для статистического анализа был выполнен ANOVA тест: * $p < 0,05$, что указывает на значимость.

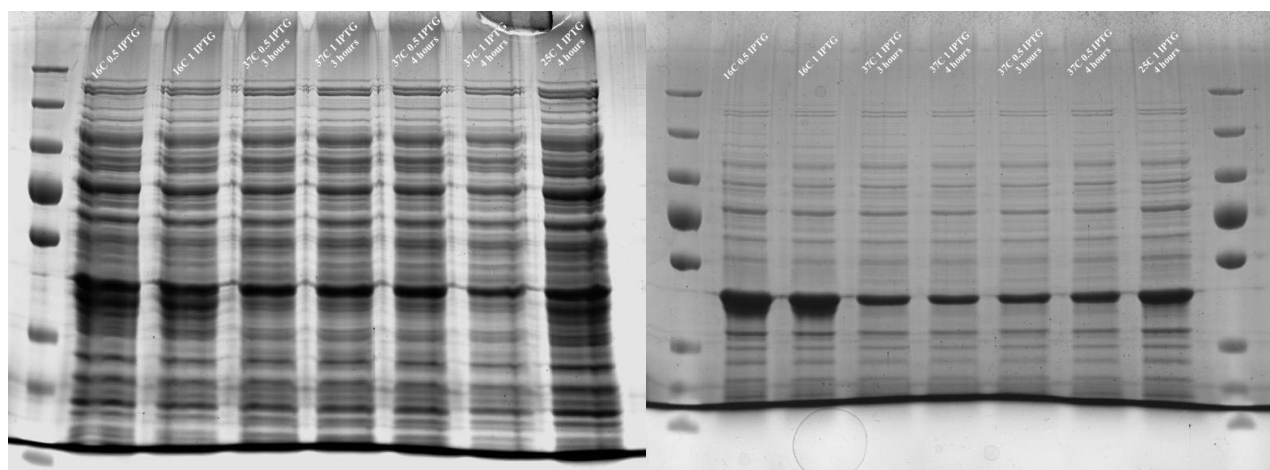


Рисунок 3. Результаты белкового электрофореза после ультразвуковой очистки (слева), результат белкового электрофореза после очистки клеточного лизата на Ni-NTA агарозе (справа). Целевой белок находится на 42 кДа.

Литература

1. *Mondal M., et al.*, Recent advances of oncolytic virus in cancer therapy. *Hum Vaccin Immunother*, 2020. 16(10): p. 2389-2402.
2. *Thorne S.H. and C.H. Contag*, Integrating the biological characteristics of oncolytic viruses and immune cells can optimize therapeutic benefits of cell-based delivery. *Gene Ther*, 2008. 15(10): p. 753-8.
3. *Cui B., et al.*, Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*, 2018. 17(4): p. 335-349.
4. *de Melo F.M., et al.*, Anti-metastatic immunotherapy based on mucosal administration of flagellin and immunomodulatory P10. *Immunol Cell Biol*, 2015. 93(1): p. 86-98.
5. *Hayashi F., et al.*, The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 2001. 410(6832): p. 1099-103.

УДК 577

ДНК-лигаза А необходима для встраивания преспейсеров в CRISPR-каскаду в системе CRISPR-Cas типа I-E

С.В. Виноградова¹, А.А. Ширяева², И.А. Балаж³, Т.С. Хвостиков², О.С. Мушарова², И.А. Федоров², К. В. Северинов³

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Сколковский институт науки и технологий

³Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт»

Системы адаптивного иммунитета прокариот CRISPR-Cas состоят из CRISPR-каскад (участков генома с идентичными повторами и разделяющими их уникальными спейсерами) и генов *cas*. CRISPR-каскады и гены *cas* вместе обеспечивают устойчивость клеток к бактериофагам и плазмидам, которые содержат протоспейсеры – последовательности, комплементарные спейсерам CRISPR-каскады. Механизм действия CRISPR-Cas систем условно можно разбить на две части: CRISPR-адаптацию (изменение генома клетки за счет встраивания новых спейсеров в каскаду) и CRISPR-интерференцию (высокоспецифичное узнавание протоспейсеров и внесение в них разрывов).

При встраивании нового преспейсера (предшественника спейсера) в CRISPR-каскаду, происходит последовательная атака 3'-концами преспейсера верхней и нижней цепей первого повтора CRISPR-каскады [1]. При этом образуются полувстроенные интермедиаты адаптации – преспейсеры, у которых 3'-концы интегрированы в CRISPR-каскады, а 5'-концы остаются на какое-то время свободными. Затем ДНК-полимераза комплементарно достраивает последовательности повторов, оставляя одноцепочечные разрывы в верхней и нижней цепи, которые должны быть лигированы. До сих пор не было показано, какая из двух клеточных лигаз *Escherichia coli*, ДНК-лигаза А и ДНК-лигаза В, зашивает разрывы в CRISPR-каскаде. В данной работе мы показываем, что за этот процесс ответственна ДНК-лигаза А. В ходе работы была получена температурно-чувствительная мутация *ligA251*, проявляющаяся при температуре выше 42°C. Количественный анализ полувстроенных интермедиатов адаптации с помощью высокопроизводительного секвенирования показал, что на фоне инактивации LigA происходит накопление полувстроенных преспейсеров, а увеличения доли CRISPR-каскад с полной интеграцией преспейсера не наблюдается. Этот результат свидетельствует о необходимости LigA для завершения процесса встраивания нового преспейсера в CRISPR-каскаду.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-74-20130.

Литература

1. *Núñez J.K., Bai L., Harrington L.B., Hinder T.L., and Doudna J.A.*, “CRISPR Immunological Memory Requires a Host Factor for Specificity,” *Mol. Cell*, vol. 62, no. 6, pp. 824–833, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.molcel.2016.04.027.

УДК 2788.578

Создание высоко онкоселективных штаммов вируса осповакцины, экспрессирующих интерферон 1 типа

Е.Р. Набережная^{1,2}, А.В. Соболева², А.В. Липатова²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский институт)

²Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгарда РАН

Онколитические вирусы перспективны в качестве противоопухолевых средств благодаря своей способности разрушать опухолевые клетки [1], эффективно реплицируясь в них, и не повреждая нормальные ткани. Экспрессия интерферона 1 типа (IFN) рекомбинантным онколитическим штаммом может привести к усилению непрямого иммуноопосредованного онколитического действия, за счет индукции экспрессии комплекса гистосовместимости I класса, увеличения активности цитотоксических

3. Matveeva O.V. and Chumakov P.M., Defects in interferon pathways as potential biomarkers of sensitivity to oncolytic viruses. *Rev Med Virol*, 2018. 28(6): p. e2008.

4. Du Z., et al., The effects of type I interferon on glioblastoma cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. 491(2): p. 343-348.

УДК 578.821.51

Сравнительное исследование онколитической активности рекомбинантных штаммов вируса осповакцины ЛИВП и MVA

К.В. Зайцева^{1,2}, Я. Шакиба^{1,2}, А.В. Липатова¹

¹Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН

²Московский физико-технический институт

Терапия с использованием онколитических вирусов — одно из интенсивно развивающихся направлений альтернативной иммунотерапии злокачественных новообразований. На основе высоко аттенуированного штамма модифицированного вируса Анкара (MVA) создано несколько рекомбинантных штаммов, которые сейчас активно исследуются и показывают многообещающие результаты в доклинических и клинических исследованиях [1, 2]. Штамм ЛИВП создан на основе штамма *Lister* после нескольких пассирований на коже телят. Штамм ЛИВП частично использовался в программе ликвидации оспы после 1971 г. Он обладает онколитическими свойствами и меньшей вирулентной активностью по сравнению с другими штаммами *Lister* [3, 4], однако он не был широко изучен в клинических исследованиях, в отличие от других штаммов вируса осповакцины. Теоретически штамм ЛИВП может иметь преимущества перед штаммом MVA в виде повышенного тропизма к определенным метастатическим опухолям и улучшенного профиля безопасности. Было показано, что штамм *Lister* индуцирует меньше провоспалительных цитокинов, например, интерлейкина-6, интерлейкина-8 и интерферона- γ , и индуцирует более высокий уровень противовоспалительных цитокинов, например, интерлейкина-10, по сравнению с другими штаммами [5, 6].

Чтобы сравнить онколитическую активность штаммов ЛИВП и MVA, а также повысить онкоселективность рекомбинантного вируса осповакцины, были сконструированы рекомбинантные штаммы ЛИВП-RFP и MVA-RFP с удаленным геном тимидинкиназы (ТК) путем вставки репортерного гена tagRFP (красный флуоресцентный белок) в последовательность гена ТК. Репликативную кинетику и онколитическую активность полученных рекомбинантных штаммов исследовали *in vitro* и *in vivo* на клеточных линиях и мышинных аллографтах метастазирующей аденокарциномы молочной железы 4T1, аденокарциномы толстой кишки CT26 и меланомы B16. Оба сконструированных рекомбинантных штамма показали высокий уровень репликации вируса в опухолевых клетках и выраженную онколитическую активность в отношении опухолевых аллографтов. Рекомбинантный штамм на основе ЛИВП (ЛИВП-RFP) показал большую селективность и цитотоксичность в отношении линии аденокарциномы молочной железы 4T1 *in vitro* и достоверно более эффективно замедлял прогрессию аллографтов 4T1 и выживание животных в экспериментах *in vivo* по сравнению с MVA-RFP.

Повышенная онкоселективность ЛИВП-RFP в отношении аденокарциномы 4T1, являющейся аналогом трижды негативного рака молочной железы человека, делает его многообещающим инструментом для разработки нового поколения рекомбинантных онколитических вирусов.

Разработка онколитических вирусов была выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 20-75-10157).

Литература

1. Husseini F., Delord J.P., Fournel-Federico C., Guillon J., Erbs P., Homerin M., Halluard C., Jemming C., Orange C., Limacher J.M., Kurtz J.E. Vectorized gene therapy of liver tumors: proof-of-concept of TG4023 (MVA-FCU1) in combination with flucytosine. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, (2017) 28(1), 169–174, doi: 10.1093/annonc/mdw440.

2. Guo Z.S., Lu B., Guo Z., Giehl E., Feist M., Dai E., Liu W., Storkus W.J., He Y., Liu Z., Bartlett D.L. Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics. *Journal for immunotherapy of cancer*, (2019) 7(1), 6, doi: 10.1186/s40425-018-0495-7.

3. Gentshev I., Adelfinger M., Josupeit R., Rudolph S., Ehrig K., Donat U., Weibel S., Chen N.G., Yu Y.A., Zhang Q., Heisig M., Thamm D., Stritzker J., Macneill A., and Szalay A.A. Preclinical evaluation of oncolytic vaccinia virus for therapy of canine soft tissue sarcoma, *PLoS One*, (2012) 7, e37239, doi: 10.1371/journal.pone.0037239.

4. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., Pyankov S.A. and Sergeev A.A. (2021) Enhancing the Protective Immune Response to Administration of a LIVP-GFP Live Attenuated Vaccinia Virus to Mice, *Pathogens*, 10, doi: 10.3390/pathogens10030377.

5. Hughes J., Wang P., Alusi G., Shi H., Chu Y., Wang J., Bhakta V., McNeish I., McCart A., Lemoine N.R., Wang, Y. Lister strain vaccinia virus with thymidine kinase gene deletion is a tractable platform for development of a new generation of oncolytic virus, *Gene Ther.*, (2015) 22, 476-484, doi: 10.1038/gt.2015.13.

6. Matsuda T., Karube H., Aruga, A. A Comparative Safety Profile Assessment of Oncolytic Virus Therapy Based on Clinical Trials, *Ther Innov Regul Sci.*, (2018) 52, 430-437, doi: 10.1177/2168479017738979.

УДК 577.352.27

Оптогенетическое изменение рН цитозоля и митохондрий клеток HeLa

А.П. Полякова¹, А.Д. Власова¹, Д.Ф. Багаева¹, С.М. Бухалович¹, А.И. Куклин^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Объединенный институт ядерных исследований

В клетке имеются различные компартменты, в которых поддерживается определенное значение рН для их оптимальной работы. Изменения рН цитозоля (pH_c) и митохондрий (pH_m) могут приводить к клеточным дисфункциям и как следствие к различным заболеваниям. Существует гипотеза о роли нарушения регуляции pH_c при развитии рака [1]. Таким образом, оптогенетическое изменение внутриклеточного рН может стать многообещающим инструментом изучения роли рН в патологических и физиологических клеточных процессах. В этой работе мы продемонстрировали опосредуемое светом защелачивание и закисление цитозоля и митохондрий клеток HeLa.

Материалы и методы. Для экспериментов использовались клетки линии HeLa. Для регуляции pH_c клеток использовались родопсины-протонные помпы: обратная протонная помпа *NsXeR* (из археи *Nanosalina* sp.) и прямая протонная помпа *Arch3* (из археи *Halorubrum sodomense*), гены которых были клонированы в вектор pсDNA3.1, содержащий также флуоресцентный белок RFP на С-конце конструкции, сигнал сортировки Membrane trafficking signal и пептид р2А между ними. Наличие р2А обеспечивало внутриклеточное разрезание конструкции протеазами, таким образом RFP оказывался равномерно распределённым по цитозоллю и не нарушал доставку родопсина в плазматическую мембрану. *NsXeR* обеспечивает светозависимый перенос протонов внутрь клетки, а *Arch3* наружу. Возбуждение этих родопсинов осуществлялось светом 590 нм. Для определения pH_c использовался генетически кодируемый флуоресцентный сенсор Sypher3s [2]. Сигнал сенсора измеряется как отношение интенсивностей флуоресценции F488/F405. Измерение pH_m осуществлялось тем же сенсором (Mito-Sypher3s) с локализацией в митохондриях. Для проверки локализации родопсинов применяли иммуоцитохимическое окрашивание.

Результаты. Работа *NsXeR* (освещение 152 с, 350 мА) вызывала закисление цитозоля клеток HeLa (ΔpH_c : $-0,66 \pm 0,02$ $n=41$; ΔpH_c контроль: $0,082 \pm 0,007$ $n=13$; $p < 0,001$), а работа *Arch3* – защелачивание (ΔpH_c : $0,374 \pm 0,008$ $n=31$; ΔpH_c контроль: $0,036 \pm 0,005$ $n=14$; $p < 0,001$) (рис.1).

pH_c в клетках млекопитающих тесно связан с рН субклеточных органелл. Во время *Arch3*-опосредованного подщелачивания цитозоля мы наблюдали также и подщелачивание митохондриального матрикса (ΔpH_m : $0,159 \pm 0,005$ $n=18$; ΔpH_m контроль: $0,005 \pm 0,004$ $n=13$; $p < 0,001$). При *NsXeR*-опосредованном подкислении цитозоля наблюдали последующее подкисление матрикса (ΔpH_m : $-0,111 \pm 0,009$ $n=8$; ΔpH_m контроль: $0,005 \pm 0,004$ $n=13$; $p < 0,001$) (рис.2).

Вывод. Показано закисление и защелачивание митохондриального матрикса при оптогенетическом изменении рН цитозоля с помощью протонных помп *Arch3* и *NsXeR*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 21-64-00018.

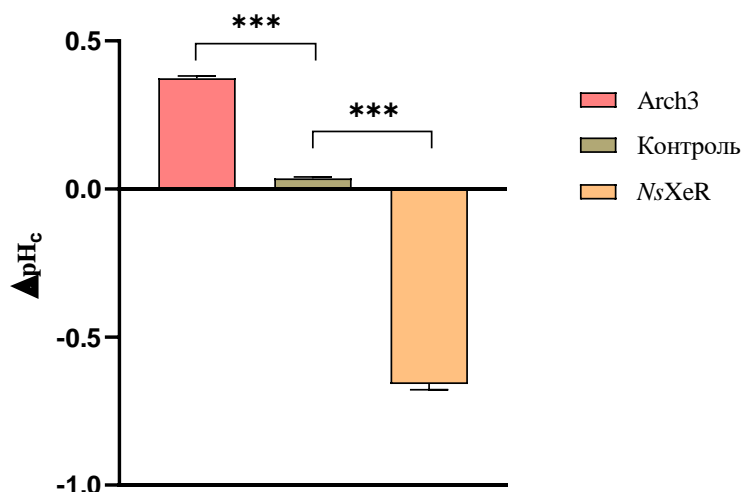


Рисунок 1. Изменение pH_c , измеренного SypHer3s, в клетках HeLa вызванное работой Arch3 и NsXeR. ***
- $p < 0,001$

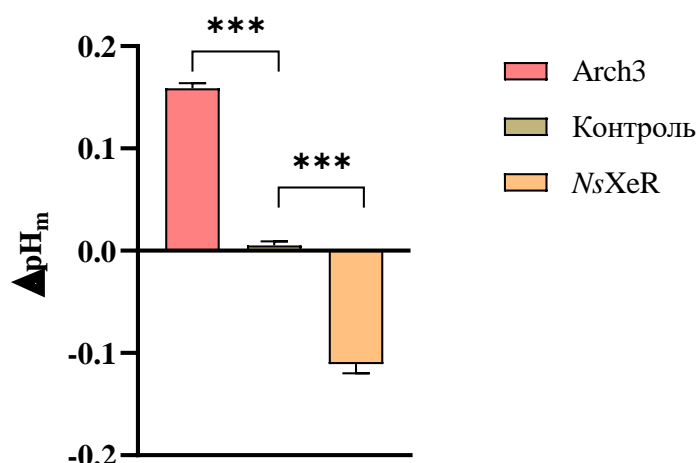


Рисунок 2. Изменение pH_m , опосредованное работой Arch3 и NsXeR и измеренное с помощью Mito-SypHer3s

Литература

1. Webb B.A., Chimenti M., Jacobson M.P., and Barber D.L., “Dysregulated pH: A perfect storm for cancer progression,” Nat. Rev. Cancer, vol. 11, no. 9, pp. 671–677, 2011, doi: 10.1038/nrc3110.
2. Ermakova Y.G. et al., “SypHer3s: a genetically encoded fluorescent ratiometric probe with enhanced brightness and an improved dynamic range,” Chem. Commun., vol. 54, no. 23, pp. 2898–2901, Mar. 2018, doi: 10.1039/C7CC08740C.

УДК 578.2; 577.2

Исследование влияния котрансфекции дополнительной плазмидой, кодирующей белок ААР 2-го серотипа, на эффективность сборки синтетических вирусных векторов

С.С. Лосев^{1,2}, О.Н. Митяева¹

¹Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

²Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева

Аденоассоциированные вирусные векторы (AAV) зарекомендовали себя перспективными агентами для доставки генов. В настоящее время FDA (Food and Drug Administration) одобрила генную терапию на основе AAV для лечения амвроза Лебера, спинальной мышечной атрофии, гемофилии Б. Также большое количество терапий других орфанных заболеваний находятся на стадии клинических испытаний [1].

Для того чтобы избежать влияния нейтрализующих антител и придать вектору необходимый тропизм, командой биоинформатиков лаборатории геномной инженерии МФТИ были созданы несколько поколений синтетических векторов методом рационального дизайна капсида. Данный метод позволяет минимизировать структурные нарушения в капсиде вируса, но находящийся в альтернативной рамке считывания ген ААР претерпевает непредсказуемые изменения. А поскольку ААР играет важную роль в фолдинге капсидных белков и является критическим фактором эффективной сборки вирусного капсида [2], то нарушение его функциональности может негативно влиять на эффективность сборки синтетических вирусных векторов. Поэтому задачей исследования было протестировать влияние

котрансфекции плазмидой AAR на качество сборки всех синтетических вирусных векторов, созданных в Центре живых систем.

Было проведено исследование влияния котрансфекции плазмидой AAR2, на эффективность сборки 18 синтетических вирусных векторов, представляющих интерес для разработки генной терапии. Количественная оценка выхода вируса производилась методом qPCR.

В результате два синтетических вектора продемонстрировали абсолютную неспособность к сборке как “без”, так и “с” котрансфекцией AAR. Один вектор продемонстрировал двухкратное улучшение эффективности сборки при котрансфекции AAR. В остальных случаях значимых изменений в эффективности сборки не наблюдалось.

Также были проведены трансфекции всех природных серотипов AAV, используемых в создании синтетических AAV, для изучения разницы в эффективности сборок между синтетическими и природными серотипами.

В качестве положительного контроля была сделана модель AAV 2-го серотипа с нокаутом AAR. Далее, с использованием этой плазмиды, была проведена трансфекция клеточной линии Нек293Т на 6-ти луночном планшете “с” и “без” котрансфекции дополнительной плазмидой, кодирующей белок AAR 2-го серотипа. В результате была показана неэффективность сборки векторов в случае отсутствия плазмиды AAR2, и полное восстановление эффективности сборки в случае котрансфекции плазмидой AAR2.

Литература

1. Li C., Samulski R.J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. Nat Rev Genet 21, 255–272 (2020).
2. Grosse S., Penaud-Budloo M., Herrmann A.-K. et al. Relevance of Assembly-Activating Protein for Adeno-associated Virus Vector Production and Capsid Protein Stability in Mammalian and Insect Cells 2017 Journal of Virology (2017) 91(20): JVI.01198-17.

УДК 616-006

Изучение влияния производных фаскаплизина на выживаемость злокачественных клеток лейкозов

М.Д.Кренгауз^{1,2}, В.О.Ведерникова^{1,2}, П.В.Спирин^{1,2}, В.С.Прасолов^{1,2}, О.А.Тряпкин³,
П.А.Смирнова³

¹Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

³ФГАОУ ВО

"Дальневосточный федеральный университет"

Лейкозы - гетерогенная группа злокачественных заболеваний крови, возникающих в костном мозге в результате мутаций в геноме гемопоэтических клеток. Это, в конечном итоге, приводит к нарушению баланса в активности сигнальных путей, отвечающих за регуляцию роста клеток, за их чувствительность к сигналам апоптоза и дифференцировку. Результатом становится возникновения пула аномальных трансформированных клеток, которые вытесняют нормальные ростки кроветворения. В настоящее время, для лечения лейкозов применяют курсы высокодозной химиотерапии, что не всегда является эффективным и не редко приводит к развитию устойчивых к такой терапии форм лейкозов. Крайне актуальным является введение в лечебную практику новых, более специфичных и безопасных препаратов. В связи с этим, поиск новых противолейкозных терапевтических соединений находится в числе актуальных задач современной биомедицины. Фаскаплизин – природное органическое соединение, выделенное из морских губок рода *Fascaplysinopsis*. По ряду данных, фаскаплизин является потенциальным ингибитором циклин-зависимой киназы CDK-4, и блокирует рост раковых клеток в фазе G1 клеточного цикла. С другой стороны, некоторые из производных фаскаплизина могут выступать в качестве модуляторов активности транскрипционного фактора E2F1, проявлять проапоптотическую активность [1]. Показано также, что они могут с высокой эффективностью связываться с ДНК клетки [2]. Данная работа посвящена исследованию противораковой активности новых оригинальных препаратов, синтезированных на основе пигмента фаскаплизина, выделенного из губки *Fascaplysinopsis*. Для этого на панели клеток различных линий лейкозов и лимфом был проведён скрининг ряда производных данного препарата. В ходе проведенных исследований была установлена чувствительность клеток лейкозов к данным препаратам и показано, что они проявляют выраженный цитотоксический эффект в отношении злокачественных клеток. Показано, что некоторые из галогенпроизводных фаскаплизина вызывают существенное замедление прохождения G2 фазы клеточного цикла. Также было установлено, что обработка клеток исследуемыми препаратами приводит к индукции апоптоза.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, грант №20-54-76005, №21-14-00355

Литература

1. Pavel Spirin [et al.] Cytotoxic Marine Alkaloid 3,10-Dibromofascaplysin Induces Apoptosis and Synergizes with Cytarabine Resulting in Leukemia Cell Death // *Marine Drugs*. 2021. V. 19. № 9. P. 489.
2. Zhidkov M.E [et al.] Study of Structure–Activity Relationships of the Marine Alkaloid Fascaplysin and Its Derivatives as Potent Anticancer Agents // *Marine Drugs*. 2022. V. 20. № 3. P. 185.

УДК 577.214.6

Получение ретровирусного вектора для системы направленной эволюции белков

М.В. Березнякова^{1,2}, Д.С. Набережнов²

¹Московский физико-технический институт

(национальный исследовательский университет)

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Направленная эволюция белков подобна естественному эволюционному процессу, но использует молекулярно-биологические методы для создания генетического разнообразия и идентификации белка с желаемыми свойствами [1]. Технологически сам процесс направленной эволюции белков заключается в циклическом повторении стадий: 1) генерации (диверсификации) вариантов последовательностей ДНК (создание библиотеки ДНК), кодирующей требуемый белок (ген интереса), 2) синтезе пула белка из полученной библиотеки, 3) селекции вариантов, удовлетворяющих требуемым характеристикам, 4) обогащении полученной библиотеки вариантов и генерации новых вариантов уже на основе имеющейся библиотеки. Процесс генерации-синтеза-селекции-обогащения повторяют до тех пор, пока белок не будет в полной мере удовлетворять требуемым свойствам. Особое место среди методов направленной эволюции в клетках модельных организмов занимают методы, позволяющие проводить мутагенез и селекцию в одной системе. Одним из таких методов является метод направленной эволюции основанный на ретровирусных векторах [2], однако для таких методов необходим вектор с промотором, не подверженным эпигенетическому замалчиванию. Целью работы являлось получение репликативно-компетентного ретровирусного вектора, не подверженного эпигенетическому замалчиванию. Для достижения данного результата нами был клонирован промотор β -actin с CMV энхансером в библиотеку плазмид, таким образом, что промотор находился на случайном расстоянии от области R лентивируса HIV. Для этого нами была получена библиотека областей U3 и R лентивируса HIV при помощи рандомной рестрикции ПЦР продукта, содержащего U3 и R области. Рандомная рестрикция проводилась с использованием эндонуклеазы рестрикции CviKI-1 в концентрациях, при которых вносился один разрыв в последовательность одной молекулы ДНК случайным образом. Полученная библиотека плазмид была трансфицирована в клетки НЕК293Т. Затем, полученная из клеток НЕК293Т библиотека лентивируса была культивирована для выявления репликативно-компетентного вектора. Вектор был получен из вируса, титр которого оставался стабильным в течение продолжительного культивирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-60031.

Литература

1. Packer M.S., Liu D.R. Methods for the directed evolution of proteins: 7 // *Nat Rev Genet*. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 16, № 7. P. 379–394.
2. Rossolillo P. et al. Retroevolution: HIV–Driven Evolution of Cellular Genes and Improvement of Anticancer Drug Activation // *PLOS Genetics*. Public Library of Science, 2012. Vol. 8, № 8. P. e1002904.

УДК 577.218

Поиск регуляторных элементов, обеспечивающих транс-сплайсинг в локусе mod(mdg4) у *Drosophila melanogaster*

О.П. Бегиязова^{1,2}, Ю.В. Солдатова¹, О.Г. Максименко¹, П.Г. Георгиев¹, М.В. Тихонов¹

¹Институт биологии гена РАН

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

У эукариот пре-мРНК, транскрибирующаяся с матрицы ДНК, должна пройти несколько этапов процессинга, прежде чем она станет зрелой матричной РНК (мРНК) и сможет участвовать в синтезе белка. Один из этапов этого процессинга, называемый сплайсингом РНК, включает в себя удаление определенных последовательностей, называемых интронами и соединение оставшихся последовательностей, называемых экзонами [1].

Часто из одной молекулы пре-мРНК могут образоваться разные функциональные мРНК за счет альтернативного сплайсинга [2]. Данный процесс контролируется РНК-связывающими белками, которые распознают определенные мотивы пре-мРНК и определяют каким из способов будут вырезаться интроны, формируя мРНК. Известно, что мотивы, которые распознаются РНК-связывающими белками, встречаются в огромном количестве по всему геному, поэтому должен существовать способ специфического привлечения белковых факторов на гены, благодаря которому будет осуществляться контроль над сплайсингом.

Пример необычного варианта альтернативного сплайсинга был обнаружен у *Drosophila melanogaster* в локусах *lola* и *mod(mdg4)*. Формирование мРНК в этих локусах осуществляется за счет транс-сплайсинга, при котором происходит соединение экзонов, находящихся в разных молекулах пре-мРНК. Транс-сплайсинг в локусе *mod(mdg4)* происходит между общим для всех изоформ 5'-донорным транскриптом и одним из 31-го варианта 3'-акцепторного транскрипта [3]. Транскрипция акцепторных транскриптов осуществляется с нескольких независимых промоторов. Локус *mod(mdg4)* является хорошей моделью, иллюстрирующей, как привлечение специфических факторов может приводить к отклонению от классической последовательности созревания мРНК и вызвать транс-сплайсинг.

Для поиска регуляторных последовательностей, которые необходимы для осуществления транс-сплайсинга локуса *mod(mdg4)* была разработана модельная система. Она состоит из донорной и акцепторной конструкций, кодирующих соответствующие транскрипты. Данные конструкции по отдельности были интегрированы в локус 22A2 второй хромосомы *Drosophila melanogaster*. Анализ проводили на трансгенных линиях мух, одновременно содержащие обе конструкции в одном локусе. Эффективность транс-сплайсинга измеряли с помощью ОТ-кПЦР и по активности люциферазы, трансляция которой возможна только с химерного транскрипта. Для выявления регуляторных элементов был получен набор конструкций с различными модификациями в донорном транскрипте.

В предыдущих работах было показано, что участок из 117 п.н, находящийся в последнем интроне-4 донорного транскрипта, является необходимым для осуществления транс-сплайсинга [4]. В настоящей работе в этом регионе обнаружено не менее четырех различных мотивов внутри этой области. Удаление любого отдельного мотива не нарушает транс-сплайсинг. Напротив, делетирование областей, затрагивающих одновременно несколько мотивов, приводят к неспособности осуществлять транс-сплайсинг или к значительному снижению эффективности этого процесса. Это наблюдение говорит об избыточности мотивов в исследуемой области и дублированию их функций.

В настоящем исследовании показано, что наличие только мотивов, находящихся в последнем интроне-4 донорного транскрипта, недостаточно для транс-сплайсинга. При последовательной замене промотора и тела гена показано, что транс-сплайсинг возможен, если присутствует любой из следующих элементов: промотор, интрон 3 или экзон 4.

Вероятной представляется модель, в которой ДНК-связывающие белки на промоторе и теле донорного гена привлекают необходимые факторы сплайсинга, в том числе и РНК-связывающие белки. Благодаря привлечению этих факторов, они могут связывать свои мотивы в интроне 4 и вызывать транс-сплайсинг.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации [075-15-2019-1661].

Литература

1. *Herzel L., Ottoz D.S.M., Alpert T., Neugebauer K.M.* Splicing and transcription touch base: co-transcriptional spliceosome assembly and function // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. V. 18. P. 637–650.
2. *Shukla S., Oberdoerffer S.* Co-transcriptional regulation of alternative pre-mRNA splicing // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1819. P. 673–683.
3. *Yu S., Waldholm J., Bohm S., Visa N.* Brahma regulates a specific trans-splicing event at the *mod(mdg4)* locus of *Drosophila melanogaster* // *RNA Biol.* 2014. V. 11. P. 134–145.
4. *Tikhonov M., Utkina M., Maksimenko O., Georgiev P.* Conserved sequences in the *Drosophila mod(mdg4)* intron promote poly(A)-independent transcription termination and trans-splicing // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. P. 10608-10618.

UDC 577.2

Design DNA Prime editing method with selection approach (BFP to GFP conversion), to improve the selection efficiency of gene-edited cells

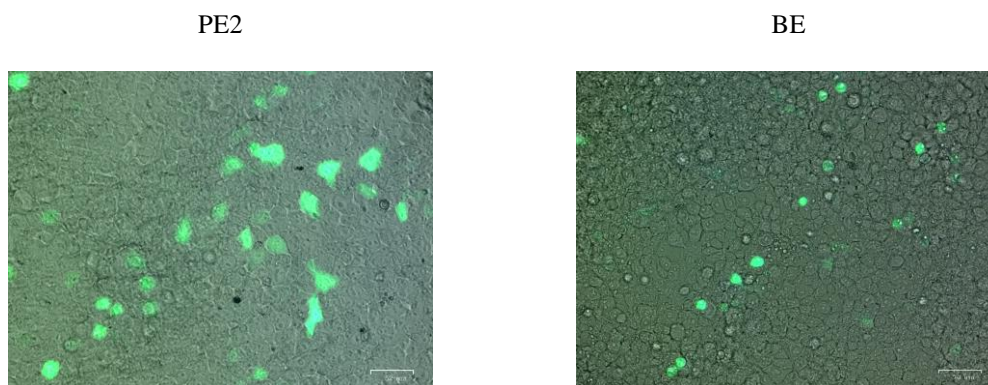
L. Alsoulaiman¹, J.M. Rozenberg¹, Il.V. Zubarev¹

¹Moscow Institute of Physics and Technology
(National Research University)

Introduction. Prime editing (PE) is a DNA editing technology depends on CAS9 nikase and reverse transcriptase (RT) and Prime editing guide RNA (pegRNA) to introduce all types of editing in DNA target site. However, it has been shown in past researches that by using green fluorescent protein (GFP) fluorescence selection, the percentage of edited cells in GFP fluorescent cells is around 10%. In our study, to increase selection efficiency, we used selection approach used in this article (2) (see references) where they use Base editing (BE), -but we used PE instead- and they get 60% editing efficiency in the GFP fluorescent cells. This selection approach uses BFP to GFP conversion as a transfection and gene-editing marker, which includes adding plasmid coding Blue fluorescent protein (BFP) to our experiment and the pegRNA needed to convert it to GFP (using PE enzymes, Cas9 nikase and RT), so we expect that the percentage of edited cells in GFP fluorescent cells will increase to >60%.

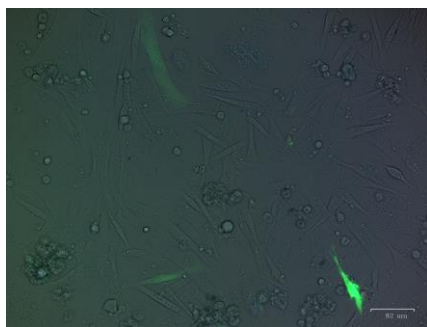
Results. 1- PE showed higher activity than Base editing (BE) in HEK293FT, when we used selection approach of BFP-to-GFP conversion, that the green fluorescent cells were detected in 24h with DNA editing efficiency >35%, and in 48h for BE with efficiency <10% (Fig.1).

-Our modified PE is more efficient and faster than BE.



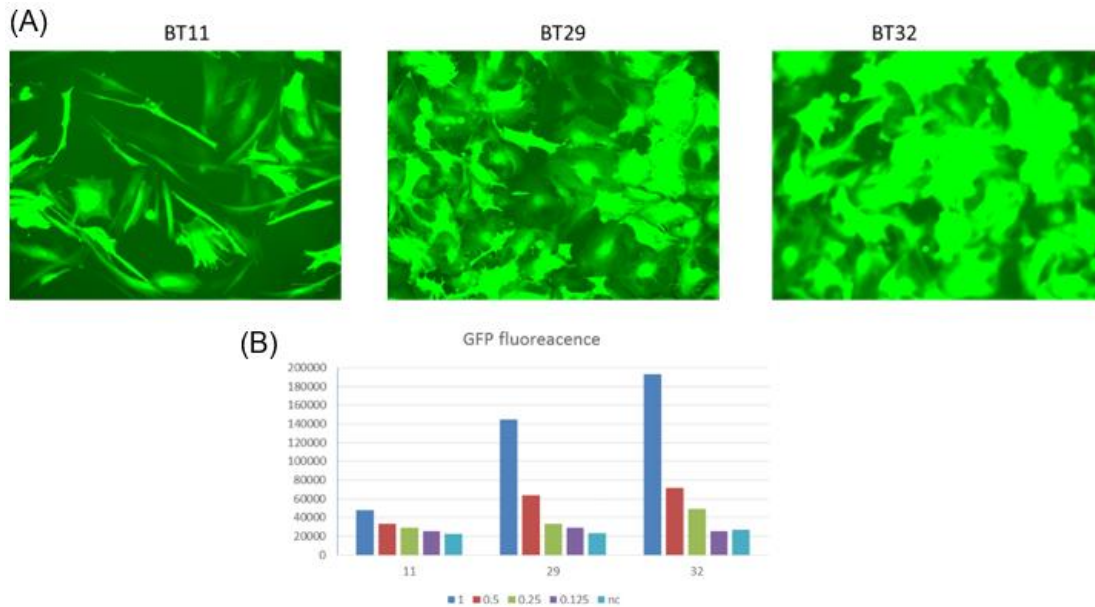
Funding 1. GFP fluorescence in HEK293FT, after modified PE and BE of (BFP to GFP).

2- Prime editing with selection approach of BFP-to-GFP conversion, worked in primary glioma cell lines by electroporation method, but the DNA editing efficiency was about 1% (Fig. 2)



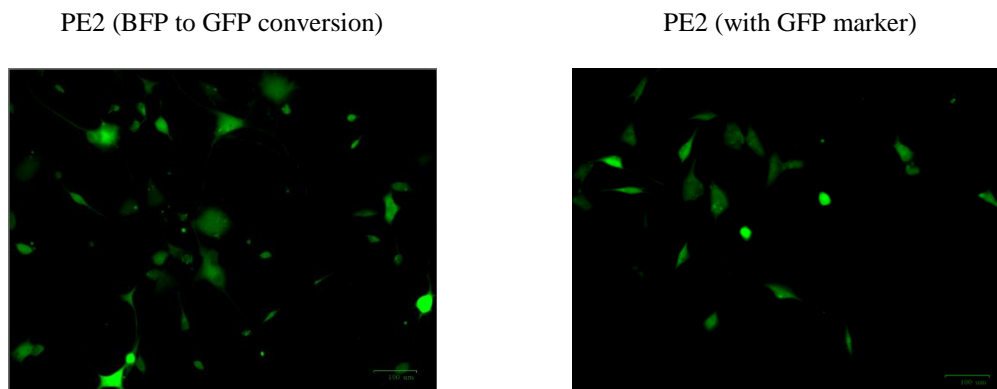
Funding 2. GFP fluorescence in glioblastoma cell line BT39, after modified PE of BFP to GFP.

- We expect that by using lentiviral delivery system to edit the genes, we will get higher transduction and gene editing efficiency, as we proved, that primary glioma cell lines are greatly transduced with lentiviruses with efficiency >90% (Fig.3).



Funding 3. (A) GFP fluorescence in transduced primary glioblastoma cell lines BT11, BT29, BT32 with lentiviruses coding GFP sequence. (B) GFP fluorescence in cell lines with different concentrations of lentivirus.

3- PE with selection approach of BFP-to-GFP conversion worked in glioblastoma cell line U87MG (Fig.4), and we will compare the efficiency of modified PE and conventional PE (which just with GFP marker), by sequencing the gene target site of pool of edited green fluorescent cells by each method separately and then check mutated to non-mutated percentage.



Funding 4. GFP fluorescence in U87MG, after modified PE and conventional PE.

Conclusions

- Our modified PE is more efficient and faster than BE in HEK293FT.
- We expect that our modified PE will get higher gene editing efficiency in the GFP fluorescent cells, than conventional PE in the studied glioma cell lines.

References

1. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R. *et al.* Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149–157 (2019).
2. Brookhouser N., Tekel S.J., Standage-Beier K., Nguyen T., Schwarz G., Wang X., Brafman D.A. BIG-TREE: Base-Edited Isogenic hPSC Line Generation Using a Transient Reporter for Editing Enrichment, *Stem Cell Reports*, Volume 14, Issue 2, 2020, Pages 184-191, ISSN 2213-6711.

Генетическая модификация лизин-продуцирующего штамма *Corynebacterium glutamicum* для превращения его в валин-продуцирующий

В.В. Розанцева^{1,2}, *М.Е. Шереметьева*¹, *К.Э. Ануфриев*¹, *Т.Е. Леонова*¹,
*Т.И. Калинина*¹, *А.С. Яненко*¹

¹НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский комплекс генетических исследований

²Московский физико-технический институт
(Национальный исследовательский университет)

Важную роль в рационе сельскохозяйственных животных занимают незаменимые аминокислоты, в частности, валин. Обогащение рациона валином в виде кормовой добавки положительно сказывается на качестве и количестве мяса поросят и цыплят-бройлеров [1]. В связи с расширением спроса на продукцию животноводства ежегодно растет и мировой рынок валина, однако производство валина в РФ пока отсутствует. Создание такого производства – важный аспект продовольственной безопасности нашей страны.

Наиболее перспективный и выгодный способ получения аминокислот – биотехнологический. Один из лучших базовых микроорганизмов для создания штаммов-продуцентов – почвенная бактерия *Corynebacterium glutamicum*. Ведущим подходом при разработке штаммов-продуцентов является метаболическая инженерия – направленное внесение модификаций в гены-мишени с известными функциями, ставшее возможным благодаря современным знаниям о генетике и метаболизме *C. glutamicum*.

Биосинтез валина у коринебактерий состоит из 4 последовательных реакций, катализируемых следующими ферментами: 1) ацетолактатсинтазой (АНАС), кодируемой генами *ilvBN*; 2) ацетолактатредуктоизомеразой (АНАИР), кодируемой геном *ilvC*; 3) дегидратазой дигидроксиацетата (DHAD), кодируемой геном *ilvD*; 4) ВСАА-трансминазой (BCAT), кодируемой геном *ilvE*.

Ключевой фермент биосинтеза валина АНАС – тетрамер, состоящий из двух структурных субъединиц (продуктов гена *ilvB*) и двух регуляторных субъединиц (продуктов гена *ilvN*). Фермент подвержен ретроингибированию аминокислотами с разветвленной боковой цепью (ВСАА), к которым относятся валин, лейцин и изолейцин. Гены АНАС и АНАИР объединены в оперон *ilvBNC* с общей регуляторной областью [1].

Для образования 1 моля валина клеткам коринебактерий необходимо 2 моля пирувата в качестве предшественника и 2 моля НАДФН в качестве кофактора. Пируват образуется из фосфоенолпирувата в гликолизе. Основным источником НАДФН – пентозофосфатный восстановительный путь (ПФП). Увеличение пула предшественников и кофакторов в клетке – важный шаг для увеличения выхода целевого продукта.

Ранее в нашей лаборатории на базе *C. glutamicum* был получен продуцент другой аминокислоты, лизина. Помимо модификаций, направленных на увеличение активности ферментов биосинтеза лизина, данный штамм содержит модификации, цель которых – усиление гликолиза и ПФП, что крайне выгодно и для продукции валина. Кроме того, продуцент лизина удобен в культивировании и несет ряд мутаций, повышающих электрокомпетентность клеток, благодаря чему облегчается редактирование генома. Поскольку все перечисленные свойства привлекательны для разработки валин-продуцирующего штамма, была предпринята попытка «превратить» лизин-продуцирующий штамм в валин-продуцирующий.

Исходным штаммом стал один из промежуточных лизин-продуцирующих штаммов со сниженной продуктивностью (VG). Способности продуцировать валин у штамма VG добились путем инактивации пути биосинтеза изолейцина, конкурирующего с биосинтезом валина за ферменты, пируват и НАДФН. Для этого делетировали ген *ilvA*, кодирующий треониндегидрогеназу, первый фермент биосинтеза изолейцина, благодаря чему процесс был полностью блокирован. У полученного штамма (VX) наблюдали появление продукции валина и снижение продукции лизина (рис.1) [2].

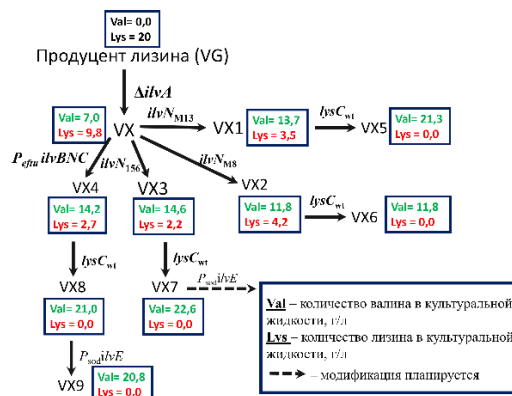


Рисунок 1. Родословная штаммов, полученных в исследовании, и их продуктивность по валину и лизину

Следующим шагом стала активация ключевого фермента биосинтеза валина – АНАС. Использовали следующие модификации: различные варианты мутаций структурной части гена *ilvN*, снимающих ретроингибирование АНАС – *ilvN_{M13}*, *ilvN_{M8}* [3], *ilvN₁₅₆* [4] (штаммы VX1, VX2 и VX3, соответственно), и замену промотора оперона *ilvBNC* сильным конститутивным промотором гена *eftu* (кодирующего фактор элонгации трансляции *tu*) для усиления экспрессии оперона (штамм VX4). Во всех случаях произошло значительное увеличение продукции валина. Наиболее сильное – двукратное – увеличение вызвали модификации $P_{eftu}ilvBNC$ и *ilvN₁₅₆* (рис.1).

Каждый из 4 новых штаммов по-прежнему выделял в культуральную жидкость заметное количество лизина, чего в продуценте валина быть не должно (рис.1). Чтобы свести образование лизина к минимуму, мы вернули ген *lysC* к дикому типу: исходный штамм VG несет точечную мутацию в гене *lysC*, снимающую ретроингибирование кодируемого им фермента биосинтеза лизина аспартаткиназы. У новых штаммов с *lysC* дикого типа (VX5-VX8) наблюдали полное прекращение продукции лизина и увеличение продукции валина в среднем в 1,5 раза (рис.1).

Во всех полученных штаммах измерили активность АНАС. Выявили многократное увеличение активности фермента, которое, однако, не коррелировало с увеличением продукции валина. Мы предположили, что это связано с ограничением процесса образования валина одной из следующих реакций его биосинтеза. Сейчас с наиболее продуктивными из новых штаммов ведется работа по усилению экспрессии последнего фермента биосинтеза валина ВСАТ. Один из штаммов, в котором ген *ilvE* поставлен под сильный конститутивный промотор супероксиддисмутазы (продукт гена *sod*), уже получен (рис. 1). Это штамм VX9 с усиленной экспрессией оперона *ilvBNC*. Было показано, что у этого штамма продукция валина осталась на прежнем уровне. Возможно, для проявления максимальной активности АНАС недостаточно только увеличить ее экспрессию, необходимо также избавиться от ретроингибирования. Чтобы прояснить картину, необходимо проверить, как усиление экспрессии гена повлияет на продуктивность штамма с мутацией *ilvN*, снимающей ретроингибирование.

Итогом данного исследования станет выявление наиболее эффективной комбинации модификаций генов биосинтеза валина, которую можно будет использовать при создании промышленного штамма- продуцента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2019-1659).

Литература

1. Шереметьева М.Е. и др. Рациональная метаболическая инженерия *Corynebacterium glutamicum* для продукции L-валина // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. Т. 26. №. 8. С. 743-757.
2. Шереметьева М.Е. и др. Использование коринебактериальных штаммов-продуцентов лизина как платформы для создания продуцентов разветвленных аминокислот // Биотехнология. 2018. Спецвыпуск. С. 58.
3. Elišáková V. et al. Feedback-resistant acetohydroxy acid synthase increases valine production in *Corynebacterium glutamicum* // Applied and environmental microbiology. 2005. V. 71. №. 1. P. 207-213.
4. Hasegawa S. et al. Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions // Applied and environmental microbiology. 2012. V. 78. №.3. P. 865-875.

УДК: 578.232.2

Морфогенез кольцевых паттернов в бляшках умеренного колифага Hf4s
 Н.И. Пушкина¹, М.А. Летарова^{1,2}

Вирусы бактерий (бактериофаги, или фаги) – постоянные спутники микробных сообществ, регулирующие их структуру и состав [1]. Умеренный подовирус Hf4s [2], выделенный из кишечника лошадей, образует на газоне штамма-хозяина *E. coli* 4s бляшки, содержащие серии чётко различимых колец из микроколоний лизогенов, разделённых зонами лизиса. В микробиологических системах кольцевые паттерны могут быть следствием неравномерного распределения некоторого фактора в пространстве и описываться моделью реакция-диффузия [3], или образовываться благодаря временным колебаниям, в соответствии с моделью фронт-осциллятор [4].

Мы модифицировали фага, введя в его геном ген устойчивости к канамицину, позволяющий отличать лизогенов от неинфицированных клеток, и установили, что частота лизогенизации клеток растёт при увеличении объёма, добавляемого фагового лизата, причём рост частоты лизогенизации нельзя объяснить только ростом числа инфицированных клеток. В то же время, при последовательном нанесении капель вирусной суспензии на растущий газон, не происходит циклических изменений частоты лизогенизации, которые могли бы приводить к появлению колец в бляшках фага Hf4s. Два этих результата свидетельствуют в пользу модели реакция-диффузия как более подходящей для нашей системы.

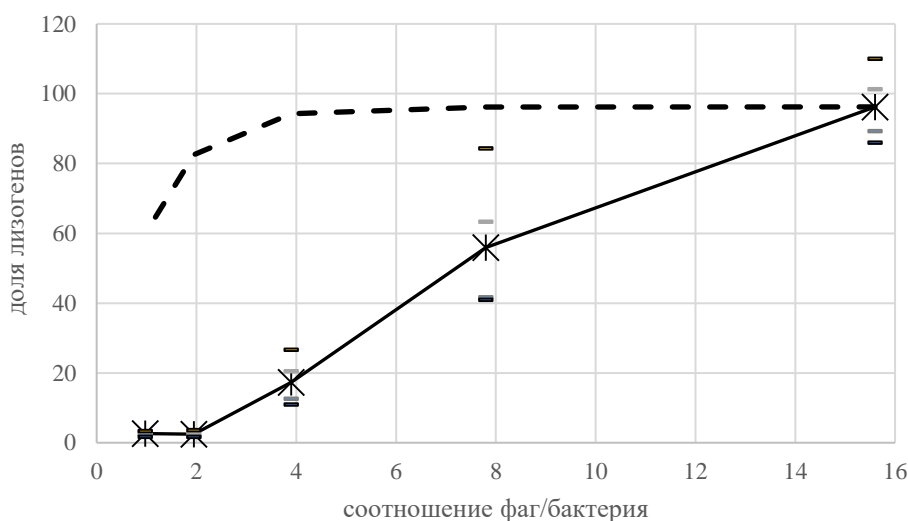


Рисунок 1. Зависимость частоты лизогенизации *E. coli* 4s фагом Hf4s от соотношения фаг/бактерия в суспензии. Сплошная линия – экспериментальная кривая, штрихами кривая, соответствующая постоянной доли лизогенов среди заражённых клеток

После ультрацентрифугирования, осаждающего большую часть вирусных частиц, лизат перестаёт оказывать заметный эффект на частоты лизогенизации клеток. Таким образом, пока мы предполагаем, что морфогенез бляшек Hf4s связан с автоколебаниями локальной концентрации вирусных частиц в агаре в пределах растущей бляшки.

Литература

1. Letarov A.V., Letarova M.A. The Burden of Survivors: How Can Phage Infection Impact Non-Infected Bacteria? // Int J Mol Sci. 2023 Feb 1;24(3):2733.
2. Kulikov EE, Golomidova A.K., Efimov A.D. et al. Equine Intestinal O-Seroconverting Temperate Coliphage Hf4s: Genomic and Biological Characterization // Appl Environ Microbiol. 2021 Oct 14;87(21):e0112421.
3. Book G., Ingham C., Ariel G. Modeling cooperating micro-organisms in antibiotic environment // PLOS ONE. 2017. T. 12. № 12. С. e0190037.
4. Chou K.T., Lee D.D., Chiou J.G. et al. A segmentation clock patterns cellular differentiation in a bacterial biofilm // Cell. 2022. T. 185. № 1. С. 145- 157.e13.

УДК 577.218

Мультивалентные ДНКзимы, как эффективные агенты для расщепления РНК

М.В. Дубовиченко¹, Д.М. Колпащиков^{1,2}

¹Университет ИТМО

²Университет Центральной Флориды

В настоящей работе мы провели модификацию геноподавляющих РНК-расщепляющих ДНКзимов Дз 10-23 путем увеличения числа РНК-расщепляющих ДНКзимов в составе одной молекулы, сделав их

тем самым «мультивалентными», т.е. способными к нахождению, комплементарному связыванию и расщеплению целевой РНК в нескольких сайтах связывания. Сами ДНКзимы – искусственно выведенные короткие фрагменты ДНК для нокдауна генов, аналогичные по действию с уже известными антисмысловыми олигонуклеотидами и малыми интерферирующими РНК, но расщепляющие мРНК генов не посредством рекрутирования нуклеаз, а используя свою собственную каталитическую активность [ссылка].

Нами была проделана работа по определению влияния наличия одного и нескольких РНК-расщепляющих ДНКзимов в составе одной молекулы, способов связывания ДНКзимов в мультивалентной молекуле, а также влияние неспецифичных нуклеотидов, присутствующих в РНК-связывающих доменах последовательностях каталитического кора у бивалентных ДНКзимов.

Экспериментальная работа проводилась на фрагменте РНК STR-58, присутствующим в гене *strA*, отвечающий за резистентность к стрептомицину у бактерий. Мы сравнили каталитическое расщепление РНК с использованием классических ДНКзимов Дз 10-23 (Дз1 и Дз2) и их мультивалентных модификаций Бд-1, Бд-2, Бд-3, Бд-4, Бд-5, Бд-6 в физиологическом буферном растворе (2 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 50 mM HEPES, 15 mM NaCl, pH = 7.45). Время инкубации РНК с расщепляющим агентом – 5 ч. Концентрация РНК STR-58 = 1000 Нм Концентрация расщепляющих агентов = 100 Нм (10:1). Расчет эффективности расщепления проводился с использованием формулы расчеты числа оборотов:

$$\text{число оборотов} = \frac{[P]}{[E] \cdot 100 \cdot T} \quad (1)$$

$$[P] = X \cdot [S] \quad (2)$$

Здесь P – концентрация расщепленного продукта, E – концентрация РНК-расщепляющего энзима (ДНКзима), T – время, X – процент расщепленной РНК, S – концентрация субстрата. Выражение числа оборотов идет в ч⁻¹.

Экспериментальные работы по сравнению мультивалентов с классическими ДНКзимами Дз 10-23 (Дз1 и Дз2) выявили, что мультивалентные модификации показали превосходство в РНК-расщеплении до 15 раз. Самый эффективный мультивалент Бд-1 за 5 ч расщепил 45% РНК с показателем оборотов 0,9 ч⁻¹. Самый слабый мултвалент Бд-2 расщепил 9% РНК (0,2 ч⁻¹). При этом немодифицированные ДНКзимы за 5 ч расщепили лишь 3% РНК (0,06 ч⁻¹). Поскольку в этом эксперименте сравнивались 6 мультивалентов с различными способами связывания ДНКзимов между собой, мы также выявили, что наиболее эффективное связывание будет с использованием химического линкера Isp18 (гексоэтиленгликоль) через 5'-3' концы, коим обладал мультивалент Бд-1.

Далее, мы провели исследование Бд-1 с внедрением однонуклеотидных замен в его последовательность, чтобы выявить их влияние на специфичность расщепление РНК. В РНК-связывающих доменах Бд1 мы заменили 34-ый нуклеотид у Дз1 и 6-й нуклеотид у Дз2. Мультивалент Бд-1 с замененным 34-м нуклеотидом показал снижение расщепления в 2,5 раза (0,4 ч⁻¹), с замененным 6-ым нуклеотидом - в 2 раза (0,45 ч⁻¹), а Бд-1 с двумя одновременными заменами - в 7 раз (0,45 ч⁻¹). Результаты показали, что наличие нуклеотидных замен хоть и снижает эффективность расщепления, но при этом совсем не убирает его полностью.

Также мы отдельно исследовали Бд1 с замененным 17-м нуклеотидом у Дз1, входящего в состав последовательности, формирующее «каталитическое ядро» ДНКзима Дз1. Известно, что внедрение этой замены полностью минимизирует РНК-расщепляющую активность ДНКзима [ссылка]. Эксперимент с «выключенным» Дз1 у Бд-2 продемонстрировал снижение РНК-расщепляющей активности в 1,6 раз (0,6 ч⁻¹) по сравнению с исходным Бд-2. При этом, отдельный ДНКзим вне бивалента совсем не показал какого-либо значимого расщепления. Мы предполагаем, что несмотря на выключение одного из ДНКзимов в составе бивалента, Бд-1 продолжал с видимой эффективностью расщеплять РНК, используя инактивированный Дз2 как один большой РНК-связывающий домен, который позволял образовывать прочную ассоциацию Бд-1 с РНК.

Рассмотренные нами мультиваленты являются перспективными средствами для нокдауна генов через расщепление РНК, с одной стороны, заметно эффективного, а, с другой, требующего дальнейшего исследования специфичности действия.

Литература

1. Morrison D., Rothenbroker M., Li Y. DNAzymes: Selected for Applications // Small Methods 2018. V. 2. P. 1700319.
2. Zaborowska Z., Furste J., Erdmann V., Kurreck J. Sequence Requirements in the Catalytic Core of the “10-23” DNA Enzyme* // Journal of Biological Chemistry 2002. V. 277. P. 40617-40622.

Engineering of genetically-modified cells secreting the HIV-1 fusion inhibitory peptide MT-C34 into the extracellular space

L. Ramadan ¹, S. Kalinichenko ²

¹Moscow Institute of Physics and Technology
(National Research University)

²Institute of gene biology, Russian Academy of Sciences (RAS)

HIV-1 is a human lentivirus that infects CD4-positive immune cells and when left untreated, it manifests in the fatal disease known as AIDS. One way to control the infection is to increase the population of HIV-1 - resistant CD4 lymphocytes. It was reported that peptides from the heptad repeat (HR) domain of HIV-1 gp41 being expressed on the cell surface are potent inhibitors of HIV-1 fusion with the host cell membrane [2].

Previously in our lab, HIV-1-resistant T cells were generated using CRISPR/Cas9-based fusion inhibitory peptide knock-in (KI) technology [3]. A series of HIV-1 fusion inhibitory peptides were embedded in CD52, the shortest glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein. One of the tested peptides, membrane-bound fusion inhibitory peptide MT-C34 exhibited significant activity against both cell-free and cell-to-cell HIV-1 infection.

The aim of this study was to generate genetically modified cells for the expression of a secreted variant of MT-C34 to prevent HIV-1 infection not only in the modified cells but also in the non-modified neighboring cells. To provide the short peptide secretion, two peptides MT-C34 were linked via a cleavage site recognized by the cellular protein convertase furin [1]. Lentiviral vectors for the expression of such concatemers were created and used for the generation of cell lines HEK293T/MT-C34-1 and HEK293T/MT-C34-2. The first cell line released the fusion inhibitory peptide MT-C34 into the extracellular space, the second one expressed both the secreted and membrane-bound variant of this peptide.

Infectivity assay of cells and supernatants of the two cell cultures have demonstrated that one of the secreted peptides MT-C34 which is produced after concatemer cleavage by furin as well as the membrane-anchored peptide MT-C34 provide a strong anti-HIV-1 protective effect and inhibit HIV-1 pseudovirus entry into the permissive HEK293T/CD4/R5 cells. Thus, the expression constructions and the engineered cell lines for secreting the fusion inhibitory peptide MT-C34 can be used for developing the peptide-based therapy of HIV-1 infection.

This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, grant number 075-15-2019-1661.

References

1. Egerer L. *et al.* Secreted antiviral entry inhibitory (SAVE) peptides for gene therapy of HIV infection. *Molecular Therapy*. 2011.7 (19).1236–1244.
2. Hildinger M. *et al.* Membrane-Anchored Peptide Inhibits Human Immunodeficiency Virus Entry. *Journal of Virology*. 2001.6 (75).3038–3042
3. Maslennikova A. *et al.* Engineering T-Cell Resistance to HIV-1 Infection via Knock-In of Peptides from the Heptad Repeat 2 Domain of gp41. *mBio*. 2022.1 (13)

УДК 608

Экспрессия генов универсальных репортёров в бактериях *Rhodococcus qingshengii* (быв. *erythropolis*)

О.В. Кожаева, К.В. Лавров, А.О. Шемякина, Е.Г. Гречишникова, А.С. Яненко.

ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт», ГосНИИГенетика

Флуоресцентные белки – это универсальные репортёры, гены которых вводят в клетки для решения широкого спектра задач визуализации, трекинга, и измерения активности различных процессов. Неприятными особенностями флуоресцентных белков являются возможная цитотоксичность их экспрессии, и медленная скорость созревания активной формы белка. Эти особенности могут по-разному проявляться в клетках разных организмов, и могут мешать эффективному использованию флуоресцентных белков в клетках. Разработано большое количество вариантов флуоресцентных белков, однако информация об уровнях цитотоксичности и скоростях созревания в разных организмах разрознена. Для бактерий *Rhodococcus*, используемых в биоремедиации и биокатализе, эта информация вообще отсутствует, несмотря на растущее число работ, в которых флуоресцентные белки используются в этих бактериях. В настоящей работе изучалась экспрессия генов флуоресцентных белков turboGFP (зелёный)

и turboRFP (красный), в клетках *Rhodococcus qingshengii* TA37 (быв. *erythropolis*), перспективного биокатализатора для получения акриловых мономеров. Задачами работы были (1) оценка влияния экспрессии этих генов на рост клеток (2), оценка скорости созревания активной формы белка. Гены флуоресцентных белков вводились на плаزمиды pRY3-Rho-P_{tuf}-turboGFP-3H (ген зелёного белка под контролем промотора P_{tuf} из *Corynebacterium glutamicum*) и pKL1-P_{T5(lacO)}-turboRFP (ген красного белка под контролем промотора P_{T5} из бактериофага T5). Указанные плазмиды вводили в клетки с помощью электротрансформации, и плазмидные штаммы - трансформанты отбирали и культивировали на твёрдой и жидкой полноценной среде ЛБ с апрамицином. Уровни экспрессии оценивали по удельной флуоресценции клеток, рассчитываемой как отношение флуоресцентной светимости в суспензии клеток к оптической плотности клеток в этой суспензии.

Уже при первичном получении трансформантов были отмечены различия в экспрессии генов красного и зелёного белков, а именно, визуальная гетерогенность окрашенности колоний с красным белком, и однородность окрашенности колоний с зелёным белком. В связи с этим, уровни экспрессии в выборке независимых клонов (по восемь клонов) были уточнены при культивировании в жидкой среде, в динамике. Независимые трансформанты с красным белком, выбранные из колоний с визуальной разной окрашенностью, демонстрировали светимость от 200 до 1200 единиц, не коррелировавшей со степенью окрашенности выбранной колонии. Светимости воспроизводились при повторных опытах. Независимые трансформанты с зелёным белком демонстрировали светимости от 5000 до 7000 единиц, и, в пределах этого диапазона, их светимости повторялись.

Влияние экспрессии исследуемых генов на скорость роста проверялось при выращивании в жидкой культуре, в сравнении с контрольным *R. qingshengii*, содержащим плазмиду без генов флуоресцентных белков. Оказалось, что скорость роста с зелёным белком не снижена (2-2,5 ед. ОП за 24 часа), а с красным белком несколько снижена (1,5 - 2 ед. ОП за 24 часа, для клонов с высоким уровнем светимости в диапазоне 1000-1200, для клонов с низким уровнем светимости рост составлял 2-2,5 ед. ОП за 24 часа). Так же в жидких опытах было два контроля: TA37 с пустой плазмидой pRY3, который дорастал до ОП 3,5-4 и штамм TA37 с плазмидой pRY3-Png-aam-cblA (плаزمиды содержала ген ациламидазы, это было нужно для определения фактора подавления роста: цитотоксичность ли это или же нагрузка на клетку за счёт экспрессии белка), который вырастал до ОП 2,5. Для оценки наработки флуоресцентного белка и скорости его созревания, из жидкой культуры в логарифмической (18-20 часов) и стационарной (40-50 часов) фазах роста отбиралась культуральная жидкость с клетками. Затем, часть клеток разрушали для оценки количества внутриклеточных флуоресцентных белков с помощью электрофореза, а часть клеток инкубировали при 4°C, для выявления изменения удельной флуоресценции клеток в отсутствие роста культуры. Оказалось, что оба исследуемых белка синтезируются уже в логарифмической фазе, и в стационарной фазе их количество возрастает вдвое. Что касается активной формы белка, то после инкубации при +4°C удельная флуоресценция клеток с обоими белками практически. Дополнительно, получены данные динамики увеличения удельной флуоресценции клеток с обоими исследуемыми белками в ходе культивирования в жидкой среде. Оказалось, что после первых суток, когда рост культуры уже остановился, в течение ещё двух суток происходит увеличение удельной флуоресценции, примерно в 1,5 раза. Это может быть объяснено «дозреванием» уже синтезированного в логарифмической стадии роста белка.

Таким образом, в *R. qingshengii* TA37 экспрессия красного флуоресцентного белка turboRFP незначительно снижала скорость роста, что указывает на определённый (хотя и не большой) уровень токсичности данного белка. Зелёный флуоресцентный белок turboGFP не влиял на рост культуры *R. qingshengii* TA37. Важным неожиданным результатом работы оказалась существенная нестабильность экспрессии гена turboRFP, возникавшая, вероятно, из-за мутаций, снижавших уровень экспрессии. Эта нестабильность исключает его использование в родококках в таких задачах, как оценка активности промоторов, во всяком случае, при уровнях экспрессии, сравнимых с полученными в настоящей работе. Экспрессия гена зелёного флуоресцентного белка turboGFP оказалась более стабильной, однако, со временем снижающейся, что говорит о том, что нам нужно оптимизировать его использование в качестве репортёрного гена в указанных выше задачах.

Работа выполнялась в рамках Государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» (номер АААА-А20-120093090015-2 от 30.09.2020).\

Литература

1. Grechishnikova E.G., Shemyakina A.O., Novikov A.D., Lavrov K.V., Yanenko A.S. Critical Reviews in Biotechnology, 04 Jul 2022, Rhodococcus: sequences of genetic parts, analysis of their functionality, and development prospects as a molecular biology platform.
2. Lavrov K.V., Larikova G.A., Yanenko A.S. Biotekhnologiya, 2012, No. 4, pp. 26–30. Novel Biocatalytic Process of N Substituted Acrylamide Synthesis.

Механизмы формирования устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов

А.Е. Егорова, П.А. Подлесная

НИИ канцерогенеза, ФГБУ “НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина” Минздрава России

Целью данной работы было изучение механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток к цитотоксическому действию макрофагов и поиск детерминант данного вида устойчивости.

Для исследования были использованы клеточные линии рака предстательной и молочной железы (PC3 и SK-BR-3) и клеточная линия миелоидного происхождения – ТНР-1. Получение цитотоксических макрофагоподобных клеток [1] проводили путем стимуляции ТНР-1 провоспалительными цитокинами. Устойчивые клоны опухолевых клеток получали путем сокультивирования последних с цитотоксическими макрофагоподобными клетками, подробнее описаным в *Таблице 1*. Анализ дифференциальной экспрессии генов полученных устойчивых производных опухолевых клеток проводился при помощи RNA-seq.

Результатом работы стало создание модельной системы, позволяющей в условиях *in vitro* моделировать процесс отбора опухолевых клеток под воздействием цитотоксической активности макрофагов. Получены производные опухолевых клеток рака предстательной и молочной желез, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов *Рис. 1*. Обнаружено, что устойчивые клетки имеют тенденцию к увеличению скорости пролиферации. В результате анализа транскриптома выявлены гены, потенциально вовлеченные в регуляцию клеточной пролиферации. Так, наблюдалось повышение экспрессии генов *BST2*, *NGFR*, *PKHD1*, *PTN*, *LGALS9*, *SIPRI*, *PTPN22*, *GPER1*, *EMB* и снижение экспрессии генов *TP63*, *IGFBP2*, *AKR1C2*, *GLP2R*, *CLDN1*, *AKR1C3*, *HPGD* в устойчивых производных клеточных линиях по сравнению с исходными *Таблица 2*. Дальнейшее изучение влияния выявленных генов на пролиферацию опухолевых клеток посредством регуляции их экспрессии позволит идентифицировать механизмы формирования их устойчивости к цитотоксическому действию макрофагов.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00291.

Таблица 1. Особенности получения экспериментальных производных клеточных линий

Клеточная линия (рабочее название)	Описание
PC3 INF γ	Клеточная линия, полученная в результате сокультивирования в смешанной культуре клеток PC3 с макрофагами, полученными в результате дифференцировки клеток линии ТНР-1 PMA и INF γ
SK-BR-3 INF γ	Клеточная линия, полученная в результате сокультивирования в смешанной культуре клеток SK-BR-3 с макрофагами, полученными в результате дифференцировки клеток линии ТНР-1 PMA и INF γ

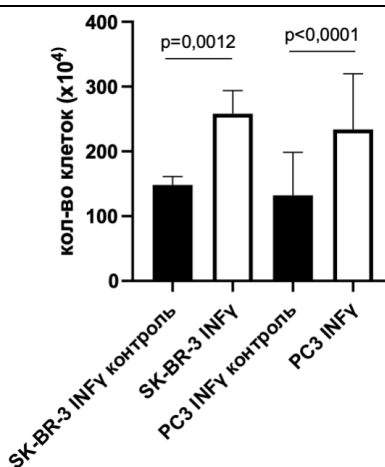


Рисунок 1. Результаты сравнения устойчивости производных и исходных опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов. Контрольные клетки – это интактные клетки, которые были подвержены сокультивированию с макрофагами впервые. Экспериментальные производные клеточных линий были получены в результате трех раундов сокультивирования с цитотоксическими макрофагами.

Таблица 2. Результаты анализа обогащения генных онтологий дифференциально экспрессирующихся генов, потенциально вовлеченных в регуляцию клеточной пролиферации в библиотеках PC3 INF γ по сравнению с контролем

ID гена	Название гена	Кратность изменения уровня экспрессии гена, log2	Скорректированные p-значения
BST2	Bone marrow stromal antigen 2	3,63	6,28*10 ⁻³²
NGFR	Nerve growth factor receptor	2,20	0,002
PKHD1	PKHD1 ciliary IPT domain containing fibrocystin/polyductin	2,21	2,19*10 ⁻⁶
PTN	Pleiotrophin	2,10	2,28*10 ⁻¹¹
EMB	Embigin	1,96	0,024
LGALS9	Galectin	1,47	0,043
S1PR1	Sphingosine-1-phosphate receptor 1	1,70	0,001
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22	1,08	0,011
GPER1	G protein-coupled estrogen receptor 1	1,21	0,004
TP63	Tumor protein p63	-1,57	5,42*10 ⁻⁸
IGFBP2	Insulin like growth factor binding protein 2	-1,81	4,36*10 ⁻³⁷
AKR1C2	Aldo-keto reductase family 1 member C2	-1,50	1,33*10 ⁻⁵
GLP2R	Glucagon-like peptide-2 receptor	-1,23	0,002
CLDN1	Claudin 1	-1,14	1,07*10 ⁻¹⁵
AKR1C3	Aldo-keto reductase family 1 member C3	-1,34	1,28*10 ⁻⁵
HPGD	15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase	-2,06	0,001

Литература

1. Ковалева О.В., Подлесная П.А., Грачев А.Н. Цитотоксическая активность макрофагов и ее роль в патогенезе опухолей // Альманах клинической медицины. – М.: МНИКИ, 2022. – Т. 50. – №1. – С. 13-20.

УДК 57.085.23

Исследование свойств скаффолдов на основе полиакриламида и хитозана, пригодных

для получения трехмерных клеточных культур

П.А. Ильина^{1,2}, А.В. Слита¹, Т.Н. Носенко², Ю.А. Новосад^{3,4}, А.В. Подшивалов²

¹ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

²Университет ИТМО

³ФГБУ НМИЦ детской травматологии и ортопедии имени Г.И. Турнера

⁴Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

В ходе данной работы были синтезированы гидрогелевые матриксы на основе полиакриламида и хитозана для трехмерного клеточного культивирования опухолевых клеток. Полиакриламид обладает рядом преимуществ, среди которых наиболее часто выделяют: прозрачность, нефлуоресцентность, а также легко регулируемую жесткость за счет изменения концентрации мономера и бис-акриламидного сшивающего агента [1, 2]. Использование природных биополимеров, таких как хитозан, в скаффолд-технологиях позволяет обеспечить биосовместимость трехмерной матрицы [2].

Для исследования были выбраны две клеточные культуры – A549 (аденокарцинома легкого человека) и RD (рабдомиосаркома человека) – которые, согласно литературным данным, часто используются для 3D-культивирования. В гидрогелевые образцы клеточные суспензии вводили с помощью инъекции, после чего скаффолды с клетками инкубировали несколько суток. Микроскопическим методом анализа было подтверждено проникновение клеток обеих культур в образцы (рис.1).

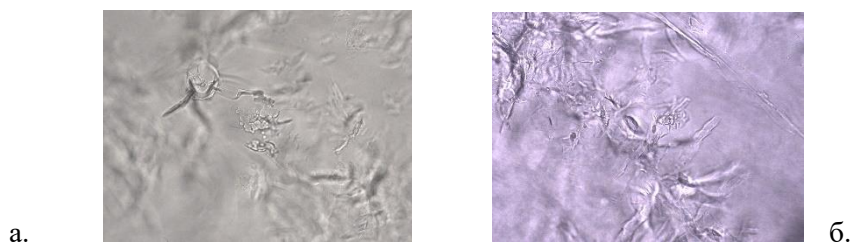


Рисунок 1. Проникновение клеток в гидрогели: а. – образец с клетками A549, б. – образец с клетками RD

Токсичность проверяли с помощью МТТ-теста, который показал, что на протяжении всего времени выдерживания скаффолдов в среде (7 суток) не происходит выделения токсичных для клеток веществ (рис.2). Для сравнения (помимо контроля) дополнительно использовались скаффолды на основе чистого полиакриламида и чистого хитозана.

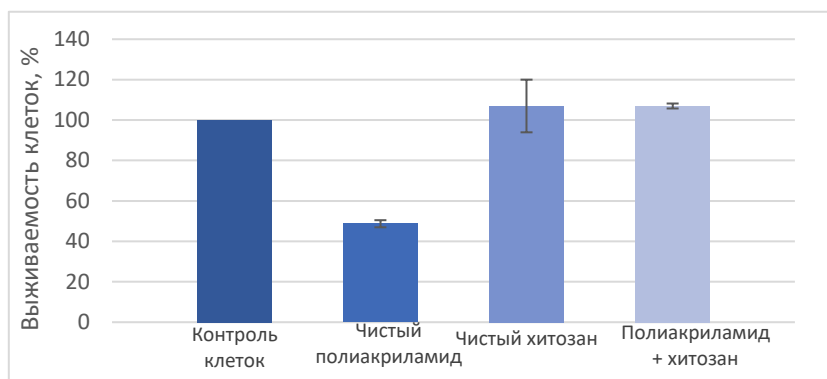


Рисунок 2. Результаты теста на цитотоксичность при 100% концентрации экстрактов гидрогелей

Результаты МТТ-теста свидетельствуют о том, что весьма удобный для выращивания клеток в трехмерном пространстве полиакриламидный матрикс, модифицированный хитозаном, не оказывает токсичного действия на клетки и может быть использован для дальнейших исследований.

Таким образом, в ходе данного исследования подтвердилась возможность использования скаффолдов на основе полиакриламида и хитозана для 3D-культивирования клеток.

Литератур

1. *Levental I., Georges P. C., Janmey P.A.* Soft biological materials and their impact on cell function // *Soft Matter*. 2007; 3:299–306.
2. *Risbud M.V., Bhonde R.R.* Polyacrylamide-Chitosan Hydrogels: In Vitro Biocompatibility and Sustained Antibiotic Release Studies // *Drug Deliv*. 2000; 7:69-75.

UDC 577.29

Eukaryotic initiation factor 4F enhances peptide release during the translation termination process

W. Al Sheikh^{1,2}, E. Shuvalova¹, A. Shuvalov¹, N. Bizyaev¹, E. Alkalaeva^{1,2}.

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, the Russian Academy of Sciences

²Moscow Institute of Physics and Technology

Eukaryotic initiation factor 4F is a trimeric multiprotein which plays a crucial role in translation as it mediates the initiation complex assembly. It consists of eIF4E, eIF4A, and eIF4G [3]. Since several studies have linked alterations in the eIF4F subunits with different physiological abnormalities, a growing interest in understanding the particular eIF4F role and in translation has gained [1, 2]. It is known, that the functions of eIF4F include recognition of the mRNA 5' cap by eIF4E, unwinding the 5' UTR by the RNA helicase eIF4A and bridging all these components with the mRNA and the ribosome by scaffold protein eIF4G. Moreover, the specific interaction of eIF4G with the poly (A)-binding protein PABP leads to the mRNA circularization [3]. Thus, due to the proximity of 5' and 3' ends during the translation process, it may be hypothesized that eIF4G may possess an additional role in translation termination as this process occurs on the stop codon near the 3' end. In order to check this hypothesis, we assembled the pre-termination complexes with nanoluciferase mRNA. After that, the involvement of eIF4G in termination of translation was assessed using peptide release assay by measuring the luminescence, which is considered as an indicator of the amount of translated luciferase. The data showed that the presence of eIF4F complex and the MIF4G-containing forms of eIF4G enhanced the peptide release from the

ribosome. Meanwhile, the W2 and MA3 domains didn't show any significant effect on the luminescence values, concluding that the MIF4G domain has a vital role in peptide release from the ribosomes.

This study was supported by Russian Science Foundation, grant № 22-14-00279.

References

1. *Kats I.R., Klann E.* Translating from cancer to the brain: regulation of protein synthesis by eIF4F// *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.) (2019), 26(9), pp. 332–342. doi: 10.1101/LM.050047.119.

2. *Malka-Mahieu H. et al.* Molecular Pathways: The eIF4F Translation Initiation Complex-New Opportunities for Cancer Treatment// *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, (2017) 23(1), pp. 21–25. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2362.

3. *Merrick W.* eIF4F: A Retrospective// *Journal of Biological Chemistry*, (2015) C. 290(40), pp. 24091–24099. doi: 10.1074/JBC.R115.675280.

Разработка биорегуляторов роста сельскохозяйственных растений класса триазинов, работающих по механизму действия растительных гормонов

И.А. Сивцев, Е.И. Марусич, М.В. Никифорова

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Проблема повышения продуктивности существующих сельскохозяйственных угодий в наше время наиболее насущна. Население мира продолжает расти и достигло 8 млрд. человек в 2022 году, а вызовы, связанные с изменением климата и устойчивым развитием, становятся все более существенными [1]. Для решения этой проблемы требуется разработка новых биорегуляторов, которые могут стимулировать рост растений и повышать урожайность сельскохозяйственных культур. Таким образом, биорегуляторы потенциально могут сыграть жизненно важную роль в решении проблем продовольственной безопасности будущего, одновременно способствуя более устойчивым и экологичным методам ведения сельского хозяйства. В данной работе исследуется биорегуляторная активность и безопасность соединений класса триазинов (рис. 1), стимулирующие активности которых были показаны ранее на модели пыльцы табака [2]. Эксперименты были проведены на новых веществах с кодовыми обозначениями 5А и 7, которые показали наибольшую активность в предыдущих работах.

На модели *Arabidopsis thaliana* была показана активность веществ 5А и 7 на стимуляцию роста массы вегетативной части растения. Семена *A. thaliana* выросли в агаре с содержанием исследуемого вещества в исследуемой концентрации. После всходов, растения были пересажены в грунт. Через 35 дней растения были изъяты из грунта, разделены на корневую и вегетативную части и взвешены. Рисунок 1 показывает массу вегетативной части растения, подвергнувшегося действию вещества в различных концентрациях в сравнении с отрицательным контролем.

Для регистрации исследуемых веществ как агрохимиката необходимо показать их безопасность для человека, животных и окружающей среды. Мы провели предварительный эксперимент на модели круглого червя *Caenorhabditis elegans* чтобы показать безопасность веществ для животных. В субстрат с живыми червями были добавлены растворы исследуемых веществ в различных концентрациях в диапазоне 1-1000 мкМ, и мы ежедневно считали количество особей в чашке Петри. Результаты эксперимента показаны на Рисунке 2. Для вещества 5А, на всём диапазоне концентраций не наблюдается значительное изменение числа особей в сравнении с отрицательным контролем. Для вещества 7, при концентрациях 10 мкМ и ниже не наблюдается отклонение от отрицательного контроля. При более высоких концентрациях было замечено значительное сокращение популяции червей.

Результаты экспериментов указывают на возможность промышленного использования исследуемых соединений 5А и 7 в качестве стимуляторов роста растений. Вещества показали высокую активность в стимуляции роста растения и привели к значительному увеличению массы вегетативной части растения при концентрациях 0.01-0.1 мкМ. Высокая активность при низких концентрациях означает малый расход вещества при использовании, легкость в транспортировке и уменьшение воздействия на окружающую среду. В предварительном эксперименте на безопасность для животных оба вещества не проявили значительную токсичность при рабочих концентрациях ниже 10 мкМ. Мы предлагаем применение этих соединений в сельском хозяйстве.

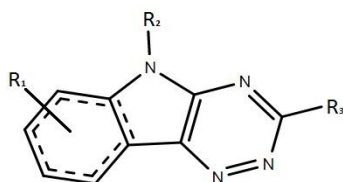


Рисунок 1. Базовая структура веществ 5А и 7.

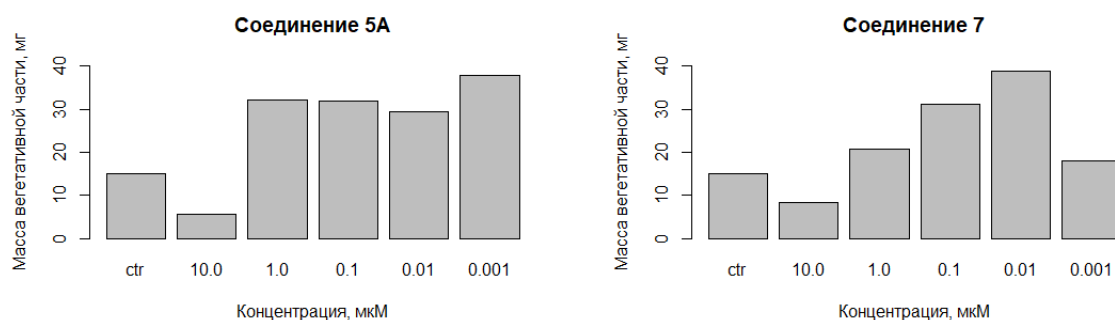


Рисунок 2. Масса вегетативной части растения после развития в присутствии соединений 5А и 7 в различных концентрациях в сравнении с отрицательным контролем.

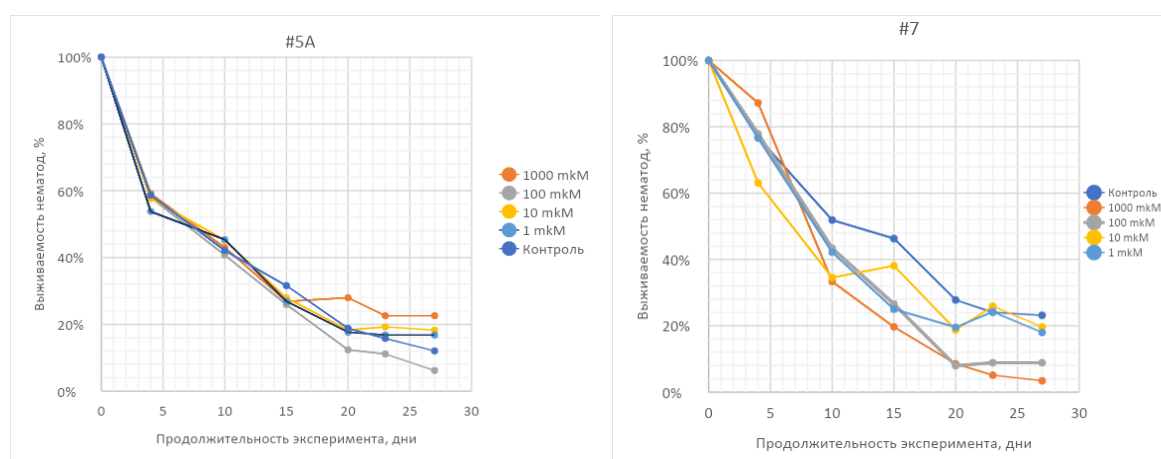


Рисунок 3. Выживаемость червей в присутствии различных концентраций исследуемых веществ в сравнении с отрицательным контролем.

Литература

1. Dieter G., Heck V., Jägermeyr J., Bodirsky B.L., Fetzer I., Jalava M., Kummu M. et al. "Feeding ten billion people is possible within four terrestrial planetary boundaries." *Nature Sustainability* 3, no. 3 (2020): 200-208.
2. Chuprov–Netochin R., Neskorođov Y., Marusich E., Mishutkina Y., Volynchuk P., Leonov S., Skryabin K., Ivashenko A., Palme K., Touraev A. "Novel small molecule modulators of plant growth and development identified by high-content screening with plant pollen." *BMC Plant Biology* 16, no. 1 (2016): 1-11.

УДК 631.811.98

Изучение диапазона биологической активности регуляторов роста растений триазинового типа на сельскохозяйственно значимых растениях

М.В. Никифорова¹, Е.И. Марусич¹, А.О. Блинков², И.А. Сивцев¹, М.Г. Дивашук²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский институт)

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии

В последние десятилетия наблюдается повышенный интерес к поиску новых регуляторов роста растений в связи с возросшей потребностью повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Ухудшающиеся экологические показатели, увеличивающаяся численность населения, изменяющийся климат – факторы, влияющие на необходимость поиска веществ, стимулирующая активность которых, поможет контролировать качество и количество сельскохозяйственных культур, выращиваемых для массового потребления. Целью настоящих исследований явилось изучение спектра биологической активности двух регуляторов роста триазинового типа, с хозяйственно полезным

эффектом регулирования на примере однодольных и двудольных сельскохозяйственных растений [1, 2].

В наших предыдущих исследованиях было показано модулирующее действие химических соединений № 7 и № 5А по ауксиновому типу в экспериментах *in vivo* на модельных растениях *Chlorella vulgaris* и *Arabidopsis thaliana*. Структура этих соединений представлена на рисунке 1.

В данных исследованиях было изучено ауксиноподобное действие тестируемых соединений при культивировании листовых и стеблевых эксплантов картофеля, а также стимулирование корнеобразования на черенках картофеля.

Цитокиновый тип действия тестируемых модуляторов роста был показан на семядолях огурца в экспериментах по стимуляции деления, а также образования хлорофилла в клетках семядолей огурца. Стимуляцию деления клеток оценивали по разнице массы вегетативной части семядолей огурца после их инкубации в течение 16 часов в присутствии соединений № 7 и № 5А при 27 °С. В результате было показано увеличение вегетативной части огурца на 16% в присутствии соединения № 5А в концентрации 1 мг/л и на 6% под влиянием соединения № 7 в концентрации 0.1 мг/л, по сравнению с негативным контролем. Стимуляцию синтеза хлорофилла в семядолях огурца определяли спектрофотометрически в водных экстрактах хлорофилла, выделенных из 5 мм дисков семядолей огурца, выдержанных 3 часа на свету при температуре 27 °С. Нами было показано, что поглощение света хлорофиллом увеличивается на 26% под влиянием № 5А в концентрации 0.1 мг/л, а соединения № 7 на 28% в той же концентрации, по сравнению с негативным контролем.

Влияние тестируемых соединений на антистрессовую активность было изучено в экспериментах на засухоустойчивость пшеницы. После 2х недель проращивания семян в почве при температуре 24 °С, при освещении 5-6 тыс. люкс и 18 часов светового дня, и при 60% постоянном поливе каждые 3 дня, растения опрыскивали соединениями № 7 и № 5А в концентрациях 2 и 4 мг/л. Затем, проводили полив растений по схеме с уменьшением количества добавляемой воды в течение последующих 2х недель. Результат определяли по сухой массе зеленой части растения через 2 недели, в сравнении с контролем.

Цитокиноподобное действие соединений № 7 и № 5А определяли также в эксперименте по их влиянию на транспирацию листьев пшеницы. В этом эксперименте семена пшеницы проращивали сначала в воде, затем через 3 суток заменяли воду на питательный солевой раствор. После 12 суток от начала эксперимента материнские листья срезали и помещали в пробирки с раствором веществ № 5А и № 7 в концентрациях 10, 1 и 0,1 мг/л. В растворе листья находились на свету, после этого их переносили в воду и оставляли еще на 1 сутки. По окончании эксперимента определили количество, испарившейся воды на 1 г массы, что также характерно веществам, обладающим цитокининовым типом активности.

Заключение. Результаты проведенных нами экспериментов на огурцах и на пшенице подтвердили цитокининовую активность веществ № 7 и № 5А. На вегетативной части листьев пшеницы была показана антистрессовая засухоустойчивая активность обоих протестированных соединений в условиях засухи. На листьях пшеницы была также продемонстрирована стимуляция транспирации под действием соединений № 7 и № 5А. На эксплантах и черенках картофеля было подтверждено показанное нами ранее на модельных растениях ауксиноподобное действие этих соединений. Таким образом, результаты наших экспериментов на практически значимых представителях сельскохозяйственных культур показали перспективность дальнейших исследований модуляторов роста и развития растений № 7 и № 5А для сельского хозяйства.

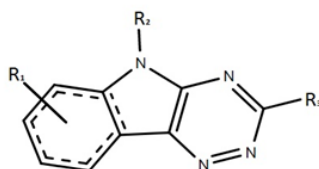


Рисунок 1. Базовая структура (ядро) исследуемых соединений № 7 и № 5А.

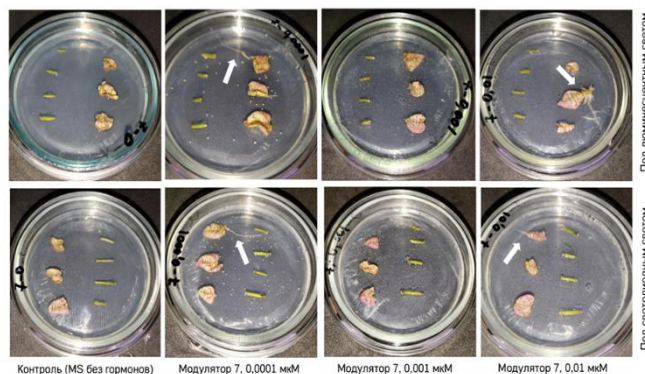


Рисунок 2. Листовые и стеблевые экспланты картофеля в присутствии соединения № 7 в различных концентрациях.

Литература

3. Chuprov–Netochin R., Neskorođov Y., Marusich E., Mishutkina Y., Volynchuk P., Leonov S., Skryabin K., Ivashenko A., Palme K., Touraev A. "Novel small molecule modulators of plant growth and development identified by high-content screening with plant pollen." *BMC Plant Biology* 16, no. 1 (2016): 1-11.

2. Bushkov N.A., Veselov M.S., Chuprov-Netochin R.N., Marusich E.I, Majouga A.G., Volynchuk P.B., Shumilina D.V., Leonov S.V., Ivanenkov Y.A. Computational insight into the chemical space of plant growth regulators. *Phytochemistry*. 2016. V. 122. P. 254.

УДК 577.22

Сборка de novo транскриптома таволги вязолистной (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim)

С.А. Протасов¹, С.И. Забарина¹, С.А. Касьянов¹, Е.А. Истомина²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Целью данной работы являлось получение качественной сборки de novo транскриптомов таволги вязолистной (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., семейство *Rosaceae*) в норме и при заражении грибным патогеном *Bipolaris sorokiniana*. *F. ulmaria* является дикорастущим растением, широко распространенным в Российской Федерации. Растение обладает высокой устойчивостью к стрессовым факторам среды, включая грибные заболевания, однако, механизмы их устойчивости не изучены.

В результате вегетационного эксперимента были получены две группы растительных образцов: группа, зараженная патогеном *B. sorokiniana* (пробы 2 и 4), и контрольная группа, обработанная стерильной водой (пробы 1 и 3 соответственно). Отбор проб для анализа проводился через 24 и 48 часов после инокуляции. Все процедуры по выделению РНК и синтеза кДНК проводили с использованием готовых реактивов фирмы «Illumina» (США) по протоколу производителя. Секвенирование проводилось на секвенаторе NextSeq 500. Для образцов, отобранных через 24 часа, были получены fastq файлы 1a, 1b и 2a, 2b с одноконцевым прочтением (~228 млн. транскриптов по 75 нк), а для образцов через 48 часов - файлы 3a, 3b и 4a, 4b (~77 млн. парных транскриптов по 150 нуклеотидов).

На рисунке 1 изображена блок-схема [1], которая кратко описывает этапы, которые были пройдены при осуществлении сборки. Для оценки качества чтений использовалась программа FastQC (версия 0.11.9). Для удаления адаптерных последовательностей и участков чтений с пониженным качеством использовалась программа Trimmomatic (версия 0.38) с параметрами "ILLUMINACLIP: TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:30 MINLEN:36".

Отфильтрованные файлы собирались с использованием программ gnaSpades (версия 3.15.4) и Trinity (версия 2.14.0), обе программы использовались с параметрами по умолчанию [2, 3]. Была проведена сборка для трех сетов данных: 1a,1b,2a,2b; 3a,3b,4a,4b; 1a,1b,2a,2b,3a,3b,4a,4b. Статистика по этим сборкам до и после аннотации приведена в таблице 1, 2.

Для оценки полноты сборок была использована программа BUSCO (версия 5.2.10) (табл. 3). Использовались следующие параметры: "-m prot -l viridiplantae_odb10". Выявлено, что сборки, составленные только из образцов 1a, 1b, 2a, 2b, показывают худшую полноту на уровне

полноразмерно собранных транскриптов. Это вызвано тем, что для данных образцов были получены только одиночные чтения.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-16-00010.



Рисунок 1. Блок-схема, описывающая процесс de novo сборки транскриптомов

Таблица 1. Статистика по длинам контигов для разных сборок

Тип набора данных	Программа сборщик	Число контигов	Максимальная длина контига, п.н.	N50, п.н.	Средняя длина контигов, п.н.	Медианная длина контигов, п.н.	GC (%)
1a,1b,2a,2b	rnaSpades	126645	7197	484	279	138	44,5
3a,3b,4a,4b	rnaSpades	169375	19059	1265	576	253	43
1a,1b,2a,2b, 3a,3b,4a,4b	rnaSpades	158615	16604	1365	687	297	43
3a,3b,4a,4b	Trinity	195805	15642	1968	1207	793	42

Таблица 2. Статистика по длинам открытых рамок считывания (CDS) для аннотаций сборок

Тип набора данных	Программа сборщик	Число контигов	Максимальная длина контига, п.н.	N50, п.н.	Средняя длина контигов, п.н.	Медианная длина контигов, п.н.	GC (%)
1a,1b,2a,2b	rnaSpades	22667	5382	834	708	555	46
3a,3b,4a,4b	rnaSpades	37650	15294	1320	981	726	45
1a,1b,2a,2b, 3a,3b,4a,4b	rnaSpades	46063	14925	1221	933	699	45
3a,3b,4a,4b	Trinity	101740	15294	1386	1053	789	44

Таблица 3. Анализ аминокислотных последовательностей согласно аннотации сборок BUSCO

Тип набора данных	Программа сборщик	Complete BUSCOs (%)	Complete and single-copy BUSCOs (%)	Complete and duplicated BUSCOs (%)	Fragmented BUSCOs (%)	Missing BUSCOs (%)
1a,1b,2a,2b	rnaSpades	237(55,1)	209(48,6)	28(6,5)	116(27,0)	77(17,9)
3a,3b,4a,4b	rnaSpades	383(89,1)	335(77,9)	48(11,2)	29(6,7)	18(4,2)
1a,1b,2a,2b, 3a,3b,4a,4b	rnaSpades	351(81,6)	264(61,4)	87(20,2)	55(12,8)	24(5,6)
3a,3b,4a,4b	Trinity	414(96,3)	218(50,7)	196(45,6)	7(1,6)	9(2,1)

Литература

1. Спринджук М.В., Можаровская Л.В., Кончиц А.П., Титов Л.П. Современные алгоритмы обработки данных транскриптомов: обзор методов и результаты апробации. // Цифровая трансформация. 2021. Т. 1. с. 53-64.
2. Bushmanova E., Antipov D., Lapidus, A., Prjibelski A. D. rnaSPAdes: A de novo transcriptome assembler and its application to RNA-seq data. // GigaScience. 2019. V. 8. P. 1-13.
3. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a

УДК 581.143.6

Получение каллусной ткани у *Nemianthus Callitrichoides* "Cuba"

А.С. Кирюшина

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева
Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии

Аннотация. Изучено влияние концентраций различных гормонов на каллусогенез водного растения *Nemianthus callitrichoides*. Стерильные экспланты были получены у компании ООО НПП "МИКРОКЛОН" и размножены на питательной среде МС *in vitro* при помощи микрочеренкования. Для получения каллусной ткани листовые экспланты надрезали в нескольких местах и высаживали на питательную среду МС с добавлением разных гормонов, в разных концентрациях. Наиболее успешным оказался вариант среды МС с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л 2,4-D.

Актуальность. *Nemianthus callitrichoides* – популярное в аквариумистике водное растение, в основном используемое в качестве покровного [1, 2]. Для улучшения сортов водных растений удобно использовать методы биотехнологии. Для упрощения работы по улучшению водных растений используют каллусную культуру.

Материалы и методы. Стерильные водные растения были приобретены у компании ООО НПП "МИКРОКЛОН". Растения культивировались на питательной среде МС [3]. Для получения каллуса использовались листовые экспланты. Было приготовлено 6 вариантов питательных сред на базе МС с разными гормонами в разных концентрациях (+ контроль без использования гормонов):

- 1) 4 мг/л 2,4-D
- 2) 0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л 2,4-D
- 3) 0,5 мг/л 6-Бап
- 4) 0,8 мг/л КИН + 0,1 мг/л ИМК
- 5) 0,1 мг/л ТДЗ + 0,1 мг/л ИМК
- 6) 0,5 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л НУК

Каждый вариант был представлен в трёх повторностях. В каждую чашку Петри сажали по 6 эксплантов. Наиболее успешным вариантом для каллусогенеза оказался второй вариант.

Заключение. В данном исследовании была выявлена оптимальная среда для каллусогенеза *Nemianthus callitrichoides*. Наиболее успешным оказался вариант среды МС с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л 2,4-D.

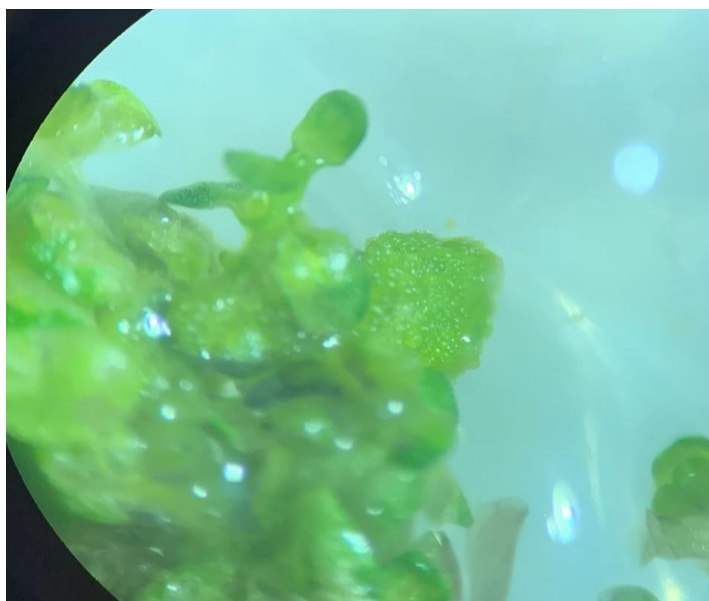


Рисунок 1. Каллусная ткань у водного растения *Nemianthus callitrichoides*

Результаты. Количество образовавшегося каллуса

Вариант	Растение
	<i>Hemianthus</i>
Контроль	0 из 6
	0 из 6
	0 из 6
1	0 из 6
	1 из 6
	1 из 6
2	3 из 6
	5 из 6
	4 из 6
3,4,5	<i>Каллуса нет</i>
6	есть частичные очаги с каллусом

Литературы

1. Acevedo-Rodríguez P., Strong MT. "Catalogue of Seed Plants of the West Indies". Smithsonian Contributions to Botany. (2012). 98: 1–1192. doi:10.5479/si.0081024X.98.1
2. *Kramer H.G.* Hemianthus callitrichoides (flora aquatica). Aquaristik Fachmagazin 169: 74, in Germany (2003)
3. *Yin S.Ng., Cun R.L.* Journal of Environmental Chemical Engineering. Development of treated Palm Oil Mill Effluent (POME) culture medium for plant tissue culture of Hemianthus callitrichoides (2016) doi:10.1016/j.jece.2016.05.004

Внеклеточные вторичные метаболиты мха *Ceratodon purpureus* подавляют рост грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*

С.М. Джабраилова, Е.В. Шакиров, Л.Р. Валеева

Казанский (Приволжский) федеральный университет

В связи с угрозой роста числа антибиотикорезистентных микроорганизмов в настоящее время активно ведется поиск новых антибактериальных соединений, из-за чего интерес к растениям – потенциальным источникам новых биологически активных соединений – значительно повысился. Бриофиты (печеночники, зеленые и антоцеротовые мхи) – обширная и разнообразная группа наземных растений, распространенная в широких пределах климатических условий: от влажных затененных мест обитания до зон с экстремально высокой температурой. Так, мох *Ceratodon purpureus* способен расти на почвах, загрязненных тяжелыми металлами, в зонах с высоким уровнем ультрафиолетового излучения, под воздействием солевого и температурного стресса и даже в экстремально холодных условиях Антарктиды [1]. Одним из механизмов, обеспечивающих устойчивость бриофитов к разнообразным видам стресса, является выработка широкого спектра уникальных вторичных метаболитов, таких как алкалоиды, полифенолы, флавоноиды и др. Кроме того, наличие активных свойств бриофитов было издревле известно человеку, что нашло применение в традиционной медицине в качестве антибактериальных, противогрибковых и противоопухолевых средств [2]. Однако наименее изученным остается биоактивный потенциал вторичных метаболитов, выделяемых бриофитами в окружающую среду. Цель данной работы – определение антибактериальной активности секретируемых метаболитов мха *Ceratodon purpureus*.

Растения *Ceratodon purpureus* линии R40 (мужское растение) и GG1 (женское растение) культивировали в жидкой среде BCD в течение 2 или 4 недель. После двух недель культивирования отбирали образцы для анализа неочищенных метаболитов: культуральную жидкость фильтровали через нейлоновое полотно, замораживали и лиофильно высушивали при -52°C . Чтобы определить устойчивость к температуре, высушенные метаболиты растворяли в деионизированной воде и кипятили в течение 5 минут. После четырех недель культивирования культуральную жидкость фильтровали и проводили очистку секретируемых метаболитов с использованием ионообменной гидрофобной смолы Amberlite XAD-16. Метаболиты экстрагировали метанолом и высушивали на роторном испарителе при 30°C . Оценку антибактериальной активности проводили диско-диффузионным методом на бактериальных тест-культурах грамположительного (*Staphylococcus aureus* ATCC25923) и грамотрицательного (*Serratia marcescens* SM6) морфотипов.

Показано, что неочищенные внеклеточные метаболиты *C. purpureus* линий R40 и GG1 обладали антибактериальной активностью по отношению к *S. aureus* (диаметр зоны ингибирования роста $9,6\pm 1,5$ мм и $9,5\pm 1,8$ мм соответственно) при концентрации 32 мг сухого вещества. Кипячение не приводило к значимому изменению активности (рис. 1). В свою очередь, полученные в результате очистки на амберлите низкомолекулярные внеклеточные метаболиты растений обеих линий подавляли рост грамположительных бактерий *S. aureus* ATCC25923 при концентрации 5 мг сухого вещества/диск (диаметр зоны подавления роста 10 ± 1 мм и 11 ± 1 мм соответственно) (рис. 2). Антибактериального действия в отношении грамотрицательных бактерий *S. marcescens* SM6 обнаружено не было ни в одном из образцов.

Таким образом, из экссудатов линий бриофита *Ceratodon purpureus* R40 и GG1 были получены фракции низкомолекулярных соединений, обладающие антибактериальной активностью по отношению к грамположительным бактериям *S. aureus*. Также было показано, что нагревание не приводит к снижению активности внеклеточных метаболитов *Ceratodon purpureus*. Дальнейший анализ биоактивных соединений из экссудатов исследуемого бриофита включает идентификацию и определение их физико-химических свойств.

Работа выполнена при поддержке стипендии Президента СП-3391.2021.4 в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

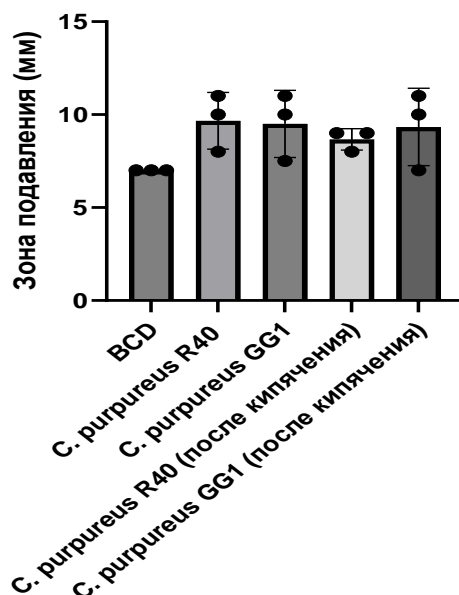


Рисунок 1. Ингибирование роста бактерий *S. aureus* под воздействием неочищенных внеклеточных метаболитов *C. purpureus* в концентрации 32 мг/диск. BCD – отрицательный контроль (отсутствие зоны ингибирования роста), диаметр диска 7 мм.

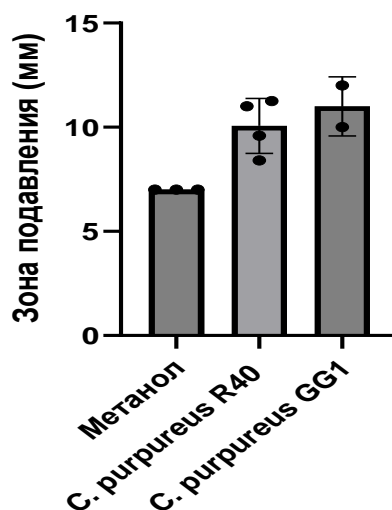


Рисунок 2. Ингибирование роста бактерий *S. aureus* под воздействием низкомолекулярной фракции внеклеточных метаболитов *C. purpureus* в концентрации 5 мг/диск. Метанол – отрицательный контроль (отсутствие зоны ингибирования роста), диаметр диска 7 мм.

Литература

1. Biersma E.M, Convey P., Wyber R., et al. Latitudinal Biogeographic Structuring in the Globally Distributed Moss *Ceratodon purpureus*. // Front Plant Sci. 2020 V.11.
2. Cianciullo P., Viviana M., Sergio S., Adriana B. "Antioxidant and Antibacterial Properties of Extracts and Bioactive Compounds in Bryophytes" // Applied Sciences. 2022. V.12(1). P. 160.

УДК 631.527

**Активация мобильных элементов для получения новых генотипов рапса
(*Brassica napus* L.)**

А.С. Ивахненко^{1,2}, И.В. Киров^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии

Стремительное изменение климата ставит перед человечеством задачу ускорения селекции растений и выведения новых устойчивых сортов. Мобильные генетические элементы (МГЭ) важны для эволюции растений и создания генетического разнообразия. В частности, всплески МГЭ, вызванные абиотическим стрессом, представляют особый интерес, поскольку могут способствовать получению новых ценных сельскохозяйственных признаков.

Масличные культуры являются второй по значимости культурой в мире и имеют высокую экономическую ценность в сельском хозяйстве. Среди них *Brassica napus* занимает второе место в мире.

Большинство МГЭ в геноме находятся в репрессированном состоянии, благодаря многочисленным системам сайленсинга, включая ДНК метилирование, модификацию гистонов и РНК интерференцию. Однако, используя мутагенный потенциал, можно добиться получения новых инсерций, которые могут нести ценные признаки для сельского хозяйства. В нашем исследовании с целью активации мобильных элементов у *Brassica napus* мы использовали технологию «TEgenesis» [1]. В ее основе лежит использование теплового стресса для активации транскрипции транспозонов и двух типов химических веществ: циклического пептида α -аманитина, мощного ингибитора Pol II, и аналога цитидина зебуларина - ингибитора ДНК-метилтрансфераз.

Из 14 дневных проростков, сразу после 24 ч теплового стресса, были получены ДНК и РНК. Проведено выделение фракции внехромосомных кольцевых молекул ДНК (eccDNA), маркеров на мобильную активность транспозонов [2]. Для определения экспрессии и транскриптомной организации транспозонов в условиях TEgenesis была получена комплементарная ДНК (cDNA). eccDNA и cDNA были секвенированы с помощью технологии Oxford Nanopore.

Получена M0 популяция растений рапса с выраженным отставанием в росте и задержкой цветения в сравнении с контролями. Для детекции наследуемых генетических изменений будет выращена популяция M1 из полученных нами семян.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание) № 075-03-2023-106, номер проекта FSMG-2023-0015.

Литература

1. Thieme M., Lanciano S., Balzergue S., Daccord N., Mirouze M., Bucher E. Inhibition of RNA polymerase II allows controlled mobilisation of retrotransposons for plant breeding // Genome Biol. – 2017. – Vol. 18. – Issue 134. – P. 1-10. <https://link.springer.com/article/10.1186/s13059-017-1265-4>

2. Lanciano S., Carpentier M.C., Llauro C., Jobet E., Robakowska-Hyzorek D., Lasserre E., Ghesquière A., Panaud O., Mirouze M. Sequencing the extrachromosomal circular mobilome reveals retrotransposon activity in plants // PLoS Genet. – 2017. – Vol. 13. – Issue 2. – e1006630.

УДК 577.29

Использование VIGS, как инструмента функциональной геномики однодольных и двудольных растений

А.А. Болотина^{1,2}, Е.С. Полховская¹, М.В. Дудников^{1,2}, И.В. Киров^{1,2}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

²Московский физико-технический институт

Благодаря стремительному развитию и широкому применению технологий секвенирования нового поколения был накоплен обширный массив знаний о сиквенсе геномов различных растений, в том числе важных сельскохозяйственных культур. Вместе с этим накопились и значительные знания о последовательностях генов и связи некоторых из них с фенотипом. Для идентификации новых генов, потенциально вовлечённых в развитие зерновки злаковых, нами был проведён комплексный анализ транскриптома с использованием нанопорового секвенирования кДНК и РНК на разных стадиях развития зерновки. Полученные нами данные демонстрируют, что 17% (7128) генов, экспрессирующихся во время развития семян, находятся в областях геномов А, В и R тритикале, которые не были аннотированы в геномах пшеницы и ржи как транскрипционно активные. Нами было

показано, что более 10% транскриптома развивающихся семян тритикале представлено днРНК, что позволяет предположить об их важной роли в данном биологическом процессе [1]. Для выявления биологической функции данных генов и их практического использования необходимым является функциональный анализ идентифицированных генов.

Один из мощных методов изучения функций генов растений – метод вирус-опосредованного сайленсинга генов (VIGS), основанный на пост-транскрипционном и транскрипционном подавлении экспрессии генов. На сегодняшний день геномы многочисленных вирусов были модифицированы в качестве векторов VIGS. Так, например вирус погремковости табака (TRV) может активно распространяться по всему растению, имеет широкий круг растений-хозяев и проявляет легкие симптомы инфекции по сравнению с другими вирусами [2, 3]. В связи с этим, TRV-опосредованный VIGS (TRV-VIGS) является одним из наиболее часто используемых для функционального анализа генов растений. Однако использование TRV-VIGS на однодольных растениях, и, в частности на пшенице, является малоизученным.

В нашей работе нами были произведены сборка и клонирование конструкций для VIGS гена фитоен-десатуразы PDS *Nicotiana benthamiana* (NbPDS) и *Triticum aestivum* L. (TaPDS). Созданные конструкции были использованы для заражения растений, используя вакуумную инфильтрацию наклюнувшихся зерновок и 3-дневных проростков пшеницы агробактериями и вирусными частицами, наработанными в растениях табака, *Nicotiana benthamiana*. Инфильтрацию 25-дневных растений табака проводили агробактериями, несущими конструкции TRV RNA2-NbPDS и TRV RNA2-TaPDS. Системное фотообесцвечивание и деформация листьев наблюдались только у растений *N. benthamiana* TRV RNA2-NbPDS, у растений TRV RNA2-TaPDS в свою очередь проявлялись только симптомы вирусного заражения. У растений *T. aestivum*, зараженных TRV RNA2-TaPDS отсутствовали как фотообесцвечивание, так и симптомы заражения вирусом. Анализ с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) свидетельствовала о репликации и системном распространении рекомбинантного TRV у *N. benthamiana*. В тоже время РНК вируса в растениях пшеницы не была детектирована как после агроинфильтрации, так и после заражения вирусными частицами. Инокулированные растения демонстрировали отсутствие симптомов заражения и, соответственно репликации вируса, что было также подтверждено анализом ОТ-ПЦР.

В ходе данного исследования было показано, что применение векторов TRV для VIGS на пшенице не приводит к заражению растений, что может быть связано с невосприимчивостью *T. aestivum* к агробактериям или самому вирусу TRV.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (№ FGUM-2022-0005).

Литература

1. Polkhovskaya E. et al. Long-Read cDNA Sequencing Revealed Novel Expressed Genes and Dynamic Transcriptome Landscape of Triticale (x Triticosecale Wittmack) Seed at Different Developing Stages //Agronomy. 2023. Т. 13. №. 2. С. 292.
2. Mellado-Sanchez M. et al. Virus-mediated transient expression techniques enable gene function studies in black-grass //Plant Physiology. 2020. Т. 183. №. 2. С. 455-459.
3. Zhang J. et al. Vacuum and co-cultivation agroinfiltration of (germinated) seeds results in tobacco rattle virus (TRV) mediated whole-plant virus-induced gene silencing (VIGS) in wheat and maize //Frontiers in plant science. 2017. Т. 8. С. 393.

УДК 577.29

Исследование ретротранскриптома растений подсолнечника *Helianthus annuus* L., подвергнутых эпигенетическому стрессу

М.Ю. Казанцев^{1,2}, П.Ю. Меркулов^{1,2}, А.С. Абрамова^{1,2}, И.В. Киров^{1,2}.

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Транспозоны (ТЕ) — это элементы генома, способные перемещаться по геному, создавая новые копии и приводя к различным геномным реорганизациям. Последние исследования показывают, что именно мобильная активность транспозонов является одной из движущих сил эволюции и селекции [1].

Известно, что около 81% генома *Helianthus annuus* L. состоит из последовательностей, относящихся к мобильным элементам, 77% из них относится к классу ретротранспозонов с длинными концевыми повторами (LTR) [2].

Способность к управлению мутагенным потенциалом мобильных элементов в качестве метода целенаправленного расширения генетического разнообразия может стать решением для запросов современной селекции, включая создание новых генотипов для отбора.

Изучение разнообразия и эволюционной динамики мобильных элементов у подсолнечника – непростая задача, особенно учитывая большие размеры генома *Helianthus annuus* L. (3,5 млрд.п.н.) и разнообразие представленных семейств мобильных элементов. Также анализ мобилома затруднен тем, что экспрессия большинства ТЕ супрессирована в нестрессовых условиях. Для активации мобилома и изучения особенностей организации активных мобильных элементов нами был применён метод TE-genesis [3]. Данный метод позволяет реактивировать мобильные элементы в геноме растений путём воздействия на системы метилирования ДНК и РНК-интерференции за счёт комбинированного воздействия стресса и определённых химических веществ.

За счёт применения нанопорового секвенирования после использования TE-genesis нам удалось идентифицировать 56 транскриптов ретротранспозонов (RTE) из разных геномных локусов, включая полноразмерные и неавтономные RTE. Используя анализ мобилома, мы выявили новый набор экспрессирующихся и транспозиционно активных RTE подсолнечника.

При помощи анализа вкДНК был обнаружен RTE *Ty3/Gypsy*, названный *SUNTY3*, демонстрировавший активность в условиях TEgenesis. Также нам удалось выяснить, что геном подсолнечника содержит значительное количество неавтономных RTE, включая TR-GAG.

Наши результаты показывают, что 40% RTE транскриптов (не LTR-RTE) схожи с обычными эукариотическими генами, которые кодируют характерные для RTE белки с неизвестными на данный момент функциями.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-64-00076.

Литература

1. Lisch D. How important are transposons for plant evolution? // Nat Rev Genet. 2013. V. 14. pp. 49–61.
2. Feschotte C., Jiang N., Wessler S. Plant transposable elements: Where genetics meets genomics // Nat. Rev. Genet. 2002. V. 3. pp. 329–341.
3. Thieme M., Lanciano S., Balzergue S., Daccord N., Mirouze M., Bucher E. Inhibition of RNA polymerase II allows controlled mobilisation of retrotransposons for plant breeding // Genome Biology. 2017. V. 18. №. 1. pp. 1-10.

УДК 57.088

Применение наночастиц железа для обработки семян озимой пшеницы: влияние на активность фотосинтеза и цикл трикарбоновых кислот

Т.Т. Кусаинова^{1,2}, Д.Д. Емекеева^{1,2}, Е.М. Казакова^{1,2}, А.В. Горшков³, Ф.Кьелдсен³, М.Л. Кусков¹, А.Н. Жигач¹, И.П. Ольховская¹, О.А. Богословская¹, Н.Н. Глущенко¹, И.А. Тарасова¹

¹ ИНЭПХФ им. В.Л. Тальрозе ФИЦ ХФ РАН

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

³ Факультет биохимии и молекулярной биологии, Университет Южной Дании

Повышенное внимание исследователей к проблемам увеличения урожайности и качества пшеницы, как важнейшего стратегического продукта питания, связано с неуклонным ростом населения и необходимостью формирования продовольственной безопасности населения. Для повышения рентабельности и эффективности сельскохозяйственного производства активно разрабатываются и внедряются новые технологии, в том числе нанобиотехнологии. Хотя ряд нанопрепаратов уже был введен в практику, разработка и испытание новых препаратов не теряет своей актуальности: остро стоят проблемы грибковых заболеваний, хранения урожая, угнетение микробиомов почв и многие другие. В свою очередь, фундаментальные аспекты механизмов биотического действия наночастиц металлов на показатели всхожести, роста и развития растений остаются слабо изученными. Целью данного исследования является исследование молекулярных изменений в проростках пшеницы, возникающих в ответ на предпосевную обработку зерна препаратами железа, и сравнение его биодоступности при введении в виде наночастиц и солей.

Семена озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. проращивали рулонным способом в течение 7 дней. Морфометрические измерения выполняли с помощью программы Morley [<https://github.com/dashabezik/Morley>]. Для профилирования протеомов использовался метод

ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрии [1]. Для оптимизации поиска был разработан алгоритм объединения гомологов на основе алгоритма BLASTP [2]. Дифференциально регулируемые белки интерпретировали с помощью анализа онтологии генов, GOATOOLS[3]. Оценку активности биологических процессов проводили с помощью программы QrePS[4].

На основе полученных данных показана зависимость активности фотосинтеза и расщепления глюкозы от концентрации железа в препарате. Активность фотосинтеза и расщепления глюкозы рассматриваются в качестве потенциальных маркеров биотического эффекта предпосевной обработки семян препаратами железа.

Работа поддержана РФФ №22-26-00109.

Литература

1. *Ivanov M.V. et al.* DirectMS1: MS/MS-Free Identification of 1000 Proteins of Cellular Proteomes in 5 Minutes // *Anal. Chem.* 2020. Vol. 92, № 6. P. 4326–4333.
2. *Li Y.-C., Lu Y.-C.* BLASTP-ACC: Parallel Architecture and Hardware Accelerator Design for BLAST-Based Protein Sequence Alignment // *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* 2019. Vol. 13, № 6. P. 1771–1782.
3. *Klopfenstein D.V. et al.* GOATOOLS: A Python library for Gene Ontology analyses // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 10872.
4. *Kazakova E.M. et al.* Proteomics-based scoring of cellular response to stimuli for improved characterization of signaling pathway activity // *Proteomics.* 2022. P. e2200275.

УДК 577.212.3

Идентификация мутаций, внесенных системой CRISPR-Cas9, в геноме полиплоидных растений

А.С. Сущенко¹, М.В. Лебедева¹, Н.Е. Злобин¹, А.В. Нежданова², В.Д. Карлов¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии

²Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Институт биоинженерии

На данный момент одним из самых широко используемых методов геномного редактирования является система CRISPR-Cas9 и ее различные модификации. Использование белка Cas9 позволяет вносить двуцепочечные разрывы в ДНК организма и приводит к 2 основным типам мутаций: инсерциям и делециям. Что может вызывать сбой рамки считывания и отсутствие функционального белка. Для детекции мутаций в диплоидных организмах может быть использовано секвенирование по Сэнгеру, анализ кривых плавления с высоким разрешением (HRM), потеря сайта рестрикции и др. Скрининг полиплоидных организмов более затруднительный из-за присутствия в геноме нескольких аллелей одного гена. В данном случае использование перечисленных выше методов для поиска мутаций нецелесообразно и непроизводительно [1, 3]. Поэтому решением проблемы является секвенирование следующего поколения (NGS), которое позволяет анализировать множество образцов во время одного запуска с высоким покрытием и определять соотношение всех типов мутаций. Высокая стоимость и трудоемкость анализа результатов прочтений является ограничением NGS. Поэтому возникает необходимость в предварительном анализе предположительно отредактированных образцов и сокращении выборки перед дальнейшим высокопроизводительным секвенированием. Оптимальным решением для скрининга является фрагментный анализ. Принцип метода заключается в амплификации последовательности с использованием флуоресцентно меченых праймеров и дальнейшим капиллярным электрофоретическим анализом с детекцией данной метки. Фиксация времени прохождения целевого ампликона через канал прибора позволяет с точностью до нескольких нуклеотидов определить длину фрагмента относительно маркерной ДНК. А сравнение анализируемого образца с диким типом поможет идентифицировать наличие indel-мутаций [2].

Коллективом лаборатории ранее была создана векторная конструкция для редактирования гена eIF4E, проведена агробактериальная трансформация *Solanum tuberosum* L. и получены растения-регенеранты. В данной работе был применен фрагментный анализ для предварительного скрининга образцов перед NGS. Проведено сравнение результатов с данными высокопроизводительного секвенирования для поиска мутаций в растениях картофеля, отредактированных системой CRISPR-Cas9. Для этого выделили геномную ДНК и выбрали праймеры с флуоресцентным красителем ROX на целевую область. После ПЦР проводили фрагментный анализ на приборе Нанофор-05. На полученной хроматограмме пики интенсивности сигнала стандартной ДНК (СД450) соответствовали определенной длине фрагментов, что позволяло установить время прохождения меченой цепи в канале прибора и определить длину фрагмента исследуемых образцов. По результатам фрагментного анализа

в растениях обнаружены мутации в несколько пар нуклеотидов. Далее те же образцы растений секвенировали с помощью Illumina MiSeq. Сравнение результатов двух анализов подтвердило точность и эффективность фрагментного анализа для предварительного скрининга редактированных образцов. Фрагментный анализ позволяет сократить выборку образцов и снизить стоимость анализа.

Работа поддержана грантом РФФИ офи_м №17-29-08024.

Литература

1. Andersson M. et al. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts // Plant Cell Rep. 2017. V. 36. P. 117-128.
2. Andersson M. et al. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery // Physiol Plant. 2018. V. 164. P. 378-384.
3. Jin Y.H. et al. Physiological impact and comparison of mutant screening methods in *piwil2* KO founder Nile tilapia produced by CRISPR/Cas9 system // Sci Rep. 2020. V. 10.

УДК 577.29

Циркулом *Solanum lycopersicum* в условиях активации мобильных элементов

М.А. Серганова¹, П.Ю. Меркулов^{2,3}, Г.А. Петров², И.В. Киров^{2,3}

¹Российский государственный аграрный университет – МСХА К.А. Тимирязева

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Значительная часть хромосомной ДНК многих растений представлена мобильными элементами (транспозонами) – последовательностями, способными перемещаться и пролиферировать внутри генома. Активность мобильных элементов находится под контролем механизмов сайленсинга. Вместе с тем мобильная активность отдельных представителей транспозонов играла ключевую роль в появлении новых видов, сортов и экотипов растений. Выявление транспозиционно активных элементов у сельскохозяйственных культур затруднено высокой долей повторяющихся элементов и большим размером генома. Поэтому использование полногеномного секвенирования для определения транспозиций является трудоёмким. Альтернативным методом изучения активного мобилома эукариот является секвенирование циркулома, пула внехромосомных кольцевых молекул ДНК (вкДНК), в составе которого могут быть детектированы молекулы кДНК активных ретротранспозонов [1].

С целью активации мобильных элементов у *Solanum lycopersicum* нами были использованы химические соединения зебуларин и альфа-аманитин, ингибирующие действие систем сайленсинга (эпигенетический стресс) [2]. В качестве активатора транскрипции транспозонов нами был также использован тепловой стресс [2, 3]. Двухнедельные растения, выращенные *in vitro* в контрольных условиях (K0) и условиях эпигенетического стресса (M0) были подвергнуты тепловому стрессу, по завершении которого часть растений была использована для выделения вкДНК согласно методике, описанной Lanciano et al. [2] с модификациями. Секвенирование вкДНК было проведено на платформе MinION (Oxford Nanopore). По истечении 10 дней после теплового стресса оставшиеся растения были перенесены в условия *ex vitro* для получения семян. Далее нами были созданы популяции растений K1 и M1. Среди 15 растений M1 было выявлено растение, характеризующееся значительными морфологическими отличиями (карликовость, большое количество листьев). Для обнаружения потенциальных генетических изменений и возможности их сопоставления с циркуломными данными нами было проведено нанопоровое секвенирование ДНК растения с изменённой морфологией, а также его sibлинга и родительского растения.

Проведённое нами исследование впервые позволяет охарактеризовать циркулом *Solanum lycopersicum* в условиях активации мобильных элементов. Полученные данные позволили идентифицировать активные ретротранспозоны томата, чья экспрессия индуцируется тепловым стрессом в условия супрессии ДНК метилирования и РНК интерференции. Обнаруженные транспозоны послужат уникальным материалом для изучения биологии мобилома, его связи с адаптацией растений к абиотическому стрессу, а также для получения новых генотипов, как исходного материала для ускоренной селекции.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации (грант МК-47.2022.5).

Литература

1. Lanciano S. et al. Sequencing the extrachromosomal circular mobilome reveals retrotransposon activity in plants // PLoS genetics. 2017. T. 13. №. 2. с. e1006630.

2. *Thieme M. et al.* Experimentally heat-induced transposition increases drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *New Phytologist*. – 2022. Т. 236. №. 1. с. 182-194.

3. *Cavrak V.V. et al.* How a retrotransposon exploits the plant's heat stress response for its activation // *PLoS genetics*. 2014. Т. 10. №. 1. с. e1004115.

УДК 577.21

Поиск мутаций в факторе инициации трансляции eIF4E картофеля для нарушения взаимодействия с вирусом Y картофеля

О.Л. Ражина, М.В. Лебедева, В.В. Таранов

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии

Картофель – четвертая по значению (после риса, пшеницы и кукурузы) продовольственная культура в мире и первая незерновая.

Наибольший вред картофелю наносят вирусные заболевания. Вирусы поражают растения, замедляя их развитие, а также вызывая морфологические изменения формы стебля и листьев, пигментацию, некроз листьев или клубней. Вирус картофеля Y (PVY) на данный момент занял ведущие позиции среди самых опасных вирусов, так как поражает широкий спектр экономически важных культур, включая картофель, табак, томат, перец, и приводит к большим потерям урожая.

Один из хорошо изученных механизмов устойчивости к PVY связан с нарушением взаимодействия фактора инициации трансляции eIF4E и вирусного белка VPg. Белок VPg ковалентно прикреплен к 5'-концу генома PVY, представляющего собой ss (+) РНК. Одной из функций VPg является имитация кэп-структуры, что обеспечивает взаимодействие с факторами инициации трансляции и запуск синтеза вирусных белков [1].

Показано что, взаимодействие с фактором eIF4E является ключевым для развития инфекции. Достаточно даже одиночных замен в структуре этих двух белков для нарушения взаимодействия [2]. Последующие исследования показали, что eIF4E-опосредованная устойчивость к потивирусам обнаруживается у нескольких устойчивых культурных сортов, включая перец (*Capsicum annuum*), салат (*Lactuca sativa*) и дикий томат (*Solanum habrochaites*) [3]. Однако на картофеле таких данных нет.

У растений факторы инициации трансляции eIF4E представлены небольшим мультигенным семейством, состав которого зависит от вида. Причем у разных растений вирусный белок способен связываться с разными факторами. Так в перце VPg взаимодействует с eIF4E-1, а в томате как с eIF4E-1, так и с eIF4E-2 [2] [4]. Мультигенное семейство картофеля состоит из eIF4E-1, eIF4E-2 и eIF(iso)4E.

Ранее нами было показано, что VPg штамма NTN (на данный момент наиболее опасный штамм, занимающий все большие территории) способен взаимодействовать с факторами инициации трансляции eIF4E-1 и eIF4E-2 картофеля, но при этом не взаимодействует с eIF(iso)4E [5]. На основании литературных данных и молекулярного моделирования мы выбрали ряд мутаций в eIF4E-1, находящиеся в области взаимодействия двух белков. Эти мутации приводят к замене одной аминокислоты на другую и потенциально способны не дать VPg связаться с фактором инициации трансляции.

Однако изменения в факторе могли привести к тому, что он перестанет быть функциональным. Для этого был проведен комплементарный анализ, основанный на использовании специального штамма дрожжей, у которого отсутствует своей собственный фактор инициации трансляции. Такие дрожжи выживают за счет введенной копии человеческого фактора инициации трансляции eIF4E под промотором, индуцируемым галактозой.

Все варианты проверялись на функциональность и способность взаимодействовать с наиболее распространенным природным VPg-NTN. В результате было отобрано два мутантных варианта, которые отвечали всем критериям, то есть: перестали взаимодействовать с базовым вариантом вирусного белка, и оставались функциональными. Однако VPg PVY способен взаимодействовать с двумя факторами инициации трансляции картофеля.

Факторы eIF4E выполняют одинаковые функции и достаточно консервативны, чтобы предположить, что эти же самые мутации сработают и для второго фактора. Для этого были заказаны специфические праймеры, несущие требуемые мутации, и с помощью пцр-мутагенеза были получены мутантные варианты фактора eIF4E-2. Их функциональность также была проверена комплементарией в дрожжах.

Широко известно, что вирусы очень быстро мутируют [6]. Было опубликовано несколько работ, где показано, что мутации в VPg способны привести к тому, что вирус начинает взаимодействовать с измененным или другим фактором инициации трансляции [6] [7]. Исходя из этого мы проанализировали все доступные последовательности VPg-NTN, представленные в базе

данных NCBI. Варианты, встречающиеся на картофеле, были воспроизведены *in vitro* и проверялись на взаимодействие с мутантными eIF4E-1 и eIF4E-2. Результаты проверки показали, что найденные мутации привели к прекращению взаимодействия с широким спектром вариантов VPg-NTN.

Литература

1. *Rantalainen K.I. et al.* Structural flexibility allows the functional diversity of potyvirus genome-linked protein VPg // *J. Virol.* 2011. V. 85. P.2449–2457
2. *Charron C. et al.* Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg // *Plant J.* 2008. V. 54. № 1. P. 56-68.
3. *Kang B.C., Yeam I., Jahn M.M.* Genetics of plant virus resistance // *Annu Rev Phytopathol.* 2005. V. 43. P. 581-621
4. *Lebaron C. et al.* A new eIF4E1 allele characterized by RNAseq data mining is associated with resistance to potato virus Y in tomato albeit with a low durability// *J. Gen. Virol.* 2016. V.97.P. 3063–3072.
5. *Лебедева М.В. и др.* VPg вируса PVY и кЭП-связывающие факторы семейства eIF4E картофеля: избирательность взаимодействия и его предполагаемый механизм// *Биохимия.* 2021. Т. 86(9). С. 1352-1365.
6. *Michel V. et al.* A complex eIF4E locus impacts the durability of va resistance to Potato virus Y in tobacco// *Mol. Plant Pathol.* 2019. V. 20.P. 1051-1066.
7. *Takakura Y. et al.* Mutation of a *Nicotiana tabacum* L. eukaryotic translation initiation factor gene reduces susceptibility to a resistance-breaking strain of Potato virus Y// *Mol. Plant Pathol.* 2018. V.19.P. 2124-2133.

УДК 577.29

Оптимизация вирус-опосредованного сайленсинга генов (VIGS) для изучения мобилома *Arabidopsis thaliana*

Е.Д. Камараули^{1,2}, А.В. Власова^{1,2}, И.В. Киров^{1,2}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

VIGS представляет собой метод обратной генетики, в основе которого лежит природный РНК-опосредованный механизм противовирусной защиты растений, приводящий к посттранскрипционному сайленсингу генов (PTGS). В данной технологии используются вирусные векторы, несущие целевой фрагмент гена, для производства двуцепочечной РНК (дцРНК), которая запускает РНК-опосредованное подавление экспрессии генов [1].

Доставка рекомбинантного вирусного вектора, несущего частичные последовательности кДНК генов-мишеней, в растения для сайленсинга генов всегда очень важна для эффективности VIGS, поэтому было разработано несколько способов введения вирусных векторов в растения. Наиболее распространенными методами доставки вирусного генома являются агроинфильтрация шприцем, вакуумная инфильтрация, заражение вирусными частичками и затопление [2].

В рамках исследований по изучению генов, вовлеченных в организацию мобилома растений, нами была проведена оптимизация условий заражения растений *Arabidopsis thaliana* рекомбинантным вирусом TRV (вирус погремковости табака). В качестве модели был использован сайленсинг гена PDS. Для этого были созданы генетические конструкции на основе бинарного вектора, содержащего геном вируса TRV, состоящего из двух РНК – RNA1 и RNA2. Конструкции были использованы для заражения растений методом агроинфильтрации и методом затопления (*agro floating*). В результате были получены растения с фенотипическими проявлениями сайленсинга гена PDS и было установлено, что наиболее эффективным методом заражения арабидопсиса является агроинфильтрация (рис. 1). Эффективность используемого метода составила 90-100%.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-64-00076.



Рисунок 1. Сайленсинг гена PDS. Заражение рекомбинантным TRV, несущим последовательность PDS, подавляет эндогенный PDS в растениях и вызывает ингибирование биосинтеза каротиноидов, что приводит к фенотипу фотообесцвечивания. Слева направо: заражение затоплением, заражение агроинфильтрацией, контроль.

Литература

1. Bomzan D.P. et al. Virus-Induced Gene Silencing for Functional Genomics of Specialized Metabolism in Medicinal Plants //Plant Gene Silencing: Methods and Protocols. – New York, NY : Springer US, 2022. – P. 147-163.
2. Shi G. et al. A methodological advance of tobacco rattle virus-induced gene silencing for functional genomics in plants //Frontiers in Plant Science. – 2021. – V. 12. – P. 671091.

УДК 575.852

Направленная активация мобильных элементов в геноме *Glycine max* L. для расширения генетического разнообразия исходных селекционных линий

И.В. Киров^{1,2}, К.Н. Тюрин^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии

Мобильные генетические элементы (МГЭ) – нуклеотидные последовательности, занимающие, как правило, большую часть генома растений и играющие роль в их эволюции и адаптационной пластичности. Совокупность всех транспозиционно активных МГЭ называется мобиломом. По механизму транспозиции МГЭ разделяются на 2 класса: ДНК-транспозоны, перемещающиеся по механизму “вырезать-вставить” и ретротранспозоны, перемещающиеся при помощи РНК-посредника по механизму “копировать-вставить”. В растительных геномах наиболее представленными являются LTR-ретротранспозоны с длинными концевыми повторами.

Жизненный цикл МГЭ включает прохождение следующих стадий: транскрипция, трансляция полипептидов и сборка вирусоподобной частицы, обратная транскрипция и интеграция в геном. Согласно последним исследованиям, значительная часть мобилома репрессирована в нормальных условиях посредством эпигенетических модификация ДНК и гистонов. Однако, в стрессовых условиях, некоторые МГЭ активно экспрессируются.

Одним из способов направленной активации МГЭ в растительных клетках является применение технологии “TEgenesis”, которая заключается в использовании специфических токсических для клеточных ферментов веществ: α -аманитина (ингибирует активность РНК-полимеразы II, вовлеченной в процесс РНК-интерференции) и зебуларина (ингибирует активность ДНК-метилаз, вовлеченных в процесс метилирования), а также создания стрессовых условий для растения [1].

В течении жизненного цикла мобильных элементов образуются кольцевые внехромосомные ДНК (вкДНК), которые выступают маркером на транспозиционную активность МГЭ в клетке [1]. ВкДНК можно детектировать при помощи нанопорового (Oxford Nanopore Technology, ONT) секвенирования и методов ПЦР.

При помощи технологии “TEgenesis” нами была получена коллекция растений *Glycine max* L. первого поколения (M0) в условиях теплового стресса. При помощи открытых баз данных проведен поиск и отбор перспективных МГЭ, которые могут экспрессироваться в данных условиях, на данном этапе было выбрано 9 кандидатов. Проведено обогащение фракции вкДНК и синтез кДНК из тотальной РНК с последующим секвенированием при помощи ONT технологии и валидация активности кандидатов методами ПЦР. В результате нами был обнаружен мобильный элемент Diaspora [2], активирующийся в ответ на тепловой стресс и воздействие токсинов у сои.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание) № 075-03-2023-106, номер проекта FSMG-2023-0015.

Литература

1. Thieme M. Inhibition of RNA polymerase II allows controlled mobilisation of retrotransposons for plant breeding / M. Thieme, S. Lanciano, S. Balzergue, N. Daccord, M. Mirouze, E. Bucher // *Genome Biol.* – 2017. – Vol. 18. – Issue 134. – P. 1-10.
2. Lanciano S., Carpentier M.-C., Llauro C., Jobet E., Robakowska-Hyzorek D., Lasserre E., Ghesquière A., Panaud O., Mirouze, M. Sequencing the Extrachromosomal Circular Mobilome Reveals Retrotransposon Activity in Plants. // *PLOS Genet.* 2017. V. 13.
3. Yano S.T., Panbehi B., Das A., Laten H.M. Diaspora, a Large Family of Ty3-Gypsy Retrotransposons in Glycine Max, Is an Envelope-Less Member of an Endogenous Plant Retrovirus Lineage. // *BMC Evol. Biol.* 2005. V. 5. P. 30.

УДК 632.3

Научные подходы к оптимизации антимикробного средства для борьбы с бактериозами сельскохозяйственных растений

Ю. О. Гусева¹, Е.И. Марусич¹, И.С. Бендик²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт физической биологии, Дюссельдорфский университет имени Генриха Гейне

Создание эффективных средств антибактерицидного действия, не являющихся токсичными для окружающей среды и потребителя, является особенно актуальным для России, а также многих других стран, для которых сельское хозяйство составляет одну из важнейших отраслей экономики. Поскольку фитопатогены важнейших сельскохозяйственных культур вызывают резистентность к синтетическим антибиотикам в условиях их бесконтрольного использования, поиск альтернативных средств борьбы, в особенности природного происхождения, является особенно актуальным в настоящее время.

В наших предыдущих исследованиях было установлено, что жирные кислоты в составе АУМЕ (водно-метанольном экстракте жира), полученном из личинок *Hermetia illucens*, проявляют антимикробные свойства против таких фитопатогенов, как *Xanthomonas campestris subsp. Campestris*, *Pantoea agglomerans*, *Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum* и *Pectobacterium atrosepticum* [1]. В настоящей работе был расширен список важнейших фитопатогенов, и методом оценки лизирования на дисках на твердом агаре было показано, что АУМЕ в диапазоне концентраций 20; 10; 5; 2,5 и 1,25 мг/мл подавляет также рост *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* (рис. 1).

Поскольку антимикробное средство может потенциально использоваться в агрессивных условиях природной среды, было важно изучить стабильность антимикробной активности препарата при повышенной температуре. С этой целью была проведена серия экспериментов при температуре 50°C на двух штаммах фитопатогенов – *Dickeya solani* (DS) и *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* (PC), а также в тех же условиях была проверена активность экстракта, разбавленного водой в 2 и в 5 раз. Результаты показали, что термическая обработка АУМЕ в течение 4х дней не

снижает его антимикробную активность в отношении обоих испытанных фитопатогенов как в неразбавленном, так и в разбавленном в 2 и в 5 раз виде.

Важным подходом в оптимизации антимикробного средства для его потенциального использования в сельском хозяйстве является его применение в сочетании с адъювантами, которые способствуют его лучшему распределению по поверхности растений и снижению его минимальной эффективной концентрации при обработке растений. Была проведена серия экспериментов с адъювантами «Агропол» и «Адью», изготовленных соответственно ООО «Листерра» (Рязанская область, Россия) и АО «Август» (Москва, Россия) на штаммах бактерий PC и DS. Каждый адъювант тестировался по норме расхода производителя, а также при 10- и 100-кратной норме.

AWME был тестирован без разведения и с разведением в 2 и 5 раз. Настоящие исследования показали, что неразбавленный AWME сохраняет антимикробную активность во всём диапазоне тестируемых концентраций с использованием обоих адъювантов против обоих фитопатогенов. Увеличение концентрации адъюванта «Адью» приводит к увеличению антимикробной активности экстракта. В присутствии адъюванта «Агропол» в 100-кратной концентрации была продемонстрирована его максимальная антимикробная активность против обоих фитопатогенов.

В данной работе была проведена оценка антимикробного действия AWME на заражённой важнейшей сельскохозяйственной культуре сои, поражённой повсеместно распространённым патогеном *Agrobacterium tumefaciens*. В качестве положительного контроля использовалась смесь антибиотиков пенициллин-стрептомицин в концентрации 100 мг/мл. Изучение взаимодействия AWME с соей производилось при +25°C; семена растения либо высаживались на питательный агар в чашке Петри с добавлением определённой концентрацией AWME, либо предварительно замачивались в растворе вещества нужной концентрации. Документировали показатели прорастания семян и их поражения бактерией. В качестве положительного контроля были использованы образцы с добавлением антибиотиков амоксицилин и доксицилин в концентрациях 800 мг/л и 100 мг/л, соответственно; в качестве отрицательного контроля были использованы образцы с добавлением водно-метанольного раствора и чистой воды. Исследования показали, что добавление AWME в агар не при каких концентрациях не защищает от поражения бактерией, причем первый эксперимент позволил установить заражение экспериментального объекта, кроме бактериальной, грибковой инфекцией. Замачивание семян в экстракте перед посадкой дало более эффективное действие, по сравнению с действием обоих антибиотиков, в присутствии которых наблюдалось развитие бактериальной инфекции на 4й день роста, при этом грибковая инфекция продолжалась развиваться в этих чашках до 7 дня эксперимента (рис. 2).

Таким образом, в ходе проведённых исследований были установлены оптимальные условия, при которых экстракт AWME способен проявлять своё защитное действие против патогенов бактериальной и грибковой природы. При концентрации AWME 300 мг/л и 400 мг/л заражённая соя была способна активно прорасти и была полностью защищена от заражения патогенами в течение 7 дней проведения эксперимента. Было показано, что максимальное защитное действие против патогенов бактериальной и грибковой природы AWME оказывает при предварительном замачивании заражённых семян в течение 3 часов.

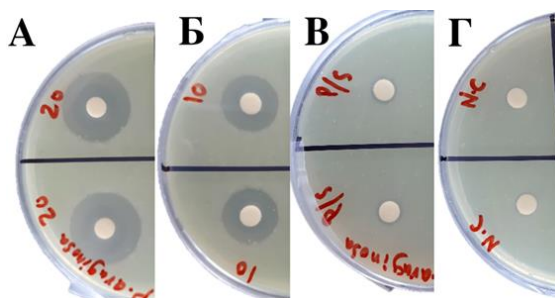


Рисунок 1. Зоны лизиса бактерий *Pseudomonas aeruginosa* под действием AWME в концентрациях 20 мг/мл (А), 10 мг/мл (Б) и контрольных антибиотиков пенициллин-стрептомицин (В) и негативного контроля (Г) после 12-часовой инкубации.

представлен eIF(iso)4E. В результате анализа полисомальной фракции нам удалось оценить количество изоформ фактора, находящегося в комплексе с рибосомами.

Исследование поддержано проектом РФФ № 21-76-10050

Литература

1. *Browning K.S.* The plant translational apparatus //Post-Transcriptional Control of Gene Expression in Plants. – 1996. – С. 107-144.
2. *J.P. Combe M.E. Petracek G. van Eldik F. Meulewaeter D.* Translation initiation factors eIF4E and eIFiso4E are required for polysome formation and regulate plant growth in tobacco //Plant molecular biology. – 2005. – Т. 57. – №. 5. – С. 749-760.
3. *Gutierrez Sanchez P.A., Babujee L., Mesa H.J., Arcibal E., Gannon M., Halterman D., Jahn M., Jiang J., Rakotondrafara A.M.* Overexpression of a modified eIF4E regulates potato virus Y resistance at the transcriptional level in potato //BMC genomics. – 2020. – Т. 21. – С. 1-16.
4. *Rubio M., Nicolai M., Caranta C., Palloix A.* Allele mining in the pepper gene pool provided new complementation effects between pvr2-eIF4E alleles and pvr6-eIF (iso) 4E for resistance to the Pepper vein mottle virus //Journal of General Virology. – 2009. – Т. 90. – №. 11. – С. 2808-2814.
5. *Salazar-Díaz K., Aquino-Luna M., Hernández-Lucero E., Nieto-Rivera B., Pulido-Torres M.A., Jorge-Pérez J.H., Gavilanes-Ruiz M., Dinkova T.D.* Arabidopsis thaliana eIF4E1 and eIF (iso) 4E Participate in Cold Response and Promote Translation of Some Stress-Related mRNAs //Frontiers in Plant Science. – 2021. – Т. 12. – С. 698585.

УДК 577.212.3

Изучение биоразнообразия генов факторов инициации трансляции у диких видов картофеля

А.Д. Антипов, Н.Е. Злобин

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии

Эукариотический фактор инициации трансляции 4E, также известный как eIF4E, представляет собой белок, который существует как в свободной форме, так и в составе преинициаторного комплекса eIF4F. Белок eIF4E необходим клеткам для трансляции с матрицы мРНК. Как правило в растениях существует целое мультисемейство генов фактора инициации трансляции eIF4E. У растений семейства *Solanaceae*, таких как картофель, томат и перец — это семейство состоит из 4 изоформ – eIF4E1, eIF4E2, eIF4Eiso и nCBP [1]. Белки eIF4E помимо своей прямой функции инициации трансляции в клетках растений, используются некоторыми вирусами для репликации и распространения этих вирусов по растению. Для семейства *Solanaceae*, и, в частности, для картофеля, самым опасным вирусным заболеванием на сегодняшний день можно считать вирус Y, заражение которым может привести к большой потере урожая. Последние исследования биоразнообразия факторов инициации трансляции у перца и томата показали наличие аллельных вариантов генов eIF4E, которые придают устойчивость растений к вирусу Y за счет несинонимичных аминокислотных замен, препятствующих использованию eIF4E вирусом [2]. Однако на сегодняшний день нет опубликованных литературных данных о наличии резистентных аллелей eIF4E у картофеля, Задачей данного исследования было провести секвенирование генов факторов инициации трансляции диких видов картофеля.

В качестве источника аллелей eIF4E были использованы дикорастущие виды картофеля *S. pinnatisectum* и *S. chacoense* предоставленные ВИР. Из растений была выделена геномная ДНК (18 растений *S. pinnatisectum* и 49 растений *S. chacoense*) методом СТАВ [3]. С геномной ДНК были амплифицированы все 4 изоформы eIF4E методом ПЦР и амплифицированные продукты были получены в очищенном виде. Секвенирование полноразмерных последовательностей осуществлялось с помощью MinION. Пробоподготовка образцов проводилась с использованием набора на 24 баркода для секвенирования методом длинных прочтений на ячейке FLO-MIN106 (OxfordNanopore). Всего было приготовлено 3 библиотеки, которые были последовательно нанесены на ячейку, и после каждого нанесения ячейка промывалась согласно протоколу от OxfordNanopore.

Полученные на выходе fast5 файлы были конвертированы в fastq формат для дальнейшей обработки. После демультимплексирования и картирования fastq файлов на референсную

последовательность (объединенную последовательность всех изоформ eIF4E, взятых из базы NCBI (сборка генома: GCF_000226075.1)), был проведен поиск полиморфизмов. Результаты анализа консенсусных последовательностей экзонных участков 4 изоформ eIF4E вида *S. chacoense* и *S. pinnatisectum* показали, что помимо наличия малого количества полиморфизмов в отдельных растениях, есть полиморфизмы, которые встречаются во всех растениях одного вида (табл. 1).

Таблица 1. Количество нуклеотидных гомозиготных полиморфизмов в консенсусных последовательностях экзонных участков 4 изоформ eIF4E, характерных для всех растений одного вида

Ген \ Вид	<i>S. chacoense</i>	<i>S. pinnatisectum</i>
eIF4E1	12	19
eIF4E2	3	9
eIF4Eiso	5 (2 из 5 в гетерозиготе)	11
nCBP	3	9

Из полученных данных видно, что у обоих видов наибольшее количество полиморфизмов имеет ген eIF4E1. На основе литературных данных можно сделать предположение, что вирус Y в картофеле в основном использует изоформу eIF4E1, то возможным объяснением наибольшего количества полиморфизмов в eIF4E-1 может быть эволюционное воздействие вируса Y и естественный отбор таких аллелей, которые не взаимодействуют с вирусными белками за счет изменения их нуклеотидной и аминокислотной последовательности. В дальнейшем планируется проанализировать аминокислотные изменения, вызванные нуклеотидными полиморфизмами и сравнить полученные белковые последовательности с литературными данными.

Исследование поддержано проектом РНФ № 21-76-10050

Литература

1. Lebaron C., Rosado A., Sauvage, C., Gauffier C., German-Retana S., Moury B., Gallois J.L. A new eIF4E1 allele characterized by RNAseq data mining is associated with resistance to PVY in tomato albeit with a low durability //Journal of General Virology. – 2016. – V. 97. – №. 11. – P. 3063-3072.
2. Charron C., Nicolai, M., Gallois J.L., Robaglia C., Moury B., Palloix A., Caranta C. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg //The Plant Journal. – 2008. – V. 54. – №. 1. – P. 56-68.
3. Хезай С.В. Применение универсального СТАВ метода для выделения днк из листьев растений //Известия Национальной Академии наук Кыргызской Республики. – 2018. – №. 1. – С. 92-97.

УДК 577.2

Pharmacological characteristics of essential oils, isolated from medicinal *Piper betle* plant with expressed aphrodisiac activity

Z.Z. Rose-Lys¹, R. Lantomahefa L^{2,3}, E. Marusich⁴, S.N. Suslina¹

¹Peoples Friendship University of Russia

²Higher Polytechnic Institute of Madagascar

³Laboratory of the National Environmental Research Center of Madagascar

⁴Moscow Institute of Physics and Technology

Piper betel, commonly called *Rambo*, has been used as a recreational and medicinal plant in Madagascar. The leaves, which are the most commonly used part of the plant, are pungent with an aromatic flavor and widely consumed as a mouth freshener. It is carminative, stimulating, astringent. In the villages located in the North-West of Madagascar (Boeny region), the *Piper betle* plant belonging to the *Piperaceae* family is a traditional medicinal plant used for several health benefits. The beneficial effects of beetle leaves and its products are traditionally used for the treatment of several diseases such as bad breath, cuts, wounds, inflammation, cold cough, indigestion, impotence, etc. Experimental studies have shown that it has various

biological and pharmacological effects, including antibacterial, antifungal, larvicidal, antiprotozoal, anticaries, gastroprotective, anti-free radical, antioxidant, anti-inflammatory, hepatoprotective, immunomodulatory, and antiulcer activities [1]. The active ingredients hydroxychavicol and eugenol with their abundance of pharmacological properties may also have the potential to be developed as lead of bioactive molecules. In this study, we assessed the pharmacological characteristics of *Piper betel* plant focusing on its ability to increase the sexual activity and even sexual impotence (libido) of human.

First, we developed the protocol of essential oil isolation from the *Piper betel* plant by using the extraction method by hydrodistillation from fresh leaves [3]. The extracted essential oil showed to be a fluidic, limpid and mobile at room temperature, light in color, ranging from yellow. Its smell is distinctly phenolic and smoky with a pungent bitterness, with pungent and unpleasant flavor (fig. 1).

Then, we developed the strategy to isolate the biologically active compounds from essential oil, design and implemented the portfolio of protocols for the characterization of a new pharmaceutical product, the toxicological study, the formulation of a new drug. Phytochemical screening by phytochemical screening analysis, revealed that the plant contains tannins (by Bate-Smith test - bluish black color), unsaturated sterols (by Salkowski test - red color), steroids (by the Liebermann Burchard test - purple or blue-green color) and triterpenoids. (by Liebermann Burchard test – purple color), as well as polysaccharides (by foam test – persistent foam height) [2]. We determined the essential oil density as 0.4%.

We used gas chromatography analysis (GC) to determine the biologically active compounds in essential oil. The GC had the following features: TRACE 1300, Column: UB-WAX (30 mx 0.32 mm x 0.5 μ m), the gas carrier was hydrogen at a pressure of 0.50 bar. The analysis revealed that the most predominant compounds (65.65%) were hydrocarbons with 22.283 of the retention time. Of the total 66 compounds found by GC, all 35 chemicals (53%) were identified and 31 (47%) were unidentified compounds (fig. 2). The most predominant compounds are eugenol (13.37%), sabinene (7.58%), terpinen-4-ol (5.78%), γ -terpinene (2.67%), germacrene D (2.65%), eugenyl acetate (2.56%) and phellandrene (2.26%). These compounds belong to the family of monoterpenes, sesquiterpenes, aldehydes, esters, etc. There were 19 monoterpenes, 11 sesquiterpenes, 1 aromatic aldehyde.

In this study was found, that the essential oil isolated from *Piper Betel* contains besides identified 66 chemical compounds still has a number of unidentified molecules. In fact, the principle active ingredients responsible for the stimulating and tonic effect in human have not been yet characterized and isolated. The identification and isolation of these molecules remains a prospect for our future study. At this stage, we can improve the drug design and formulation, and will move towards to bring new products to market. A more advanced financial study will be considered to add value to the finished products resulting from the transformations that we have just carried out.

Acknowledgement. Thanks to the Ankarafantsika National Park, the International Associated Laboratory of Madagascar, and the National Center for the Environment of Madagascar, we have enabled us to implement all our experiments on their facilities, as well as for their supervision and support.

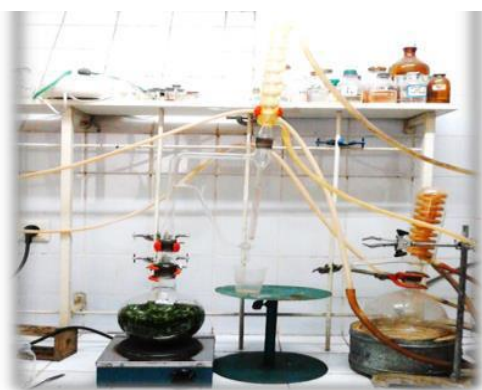


Figure 1. Extraction of essential oil

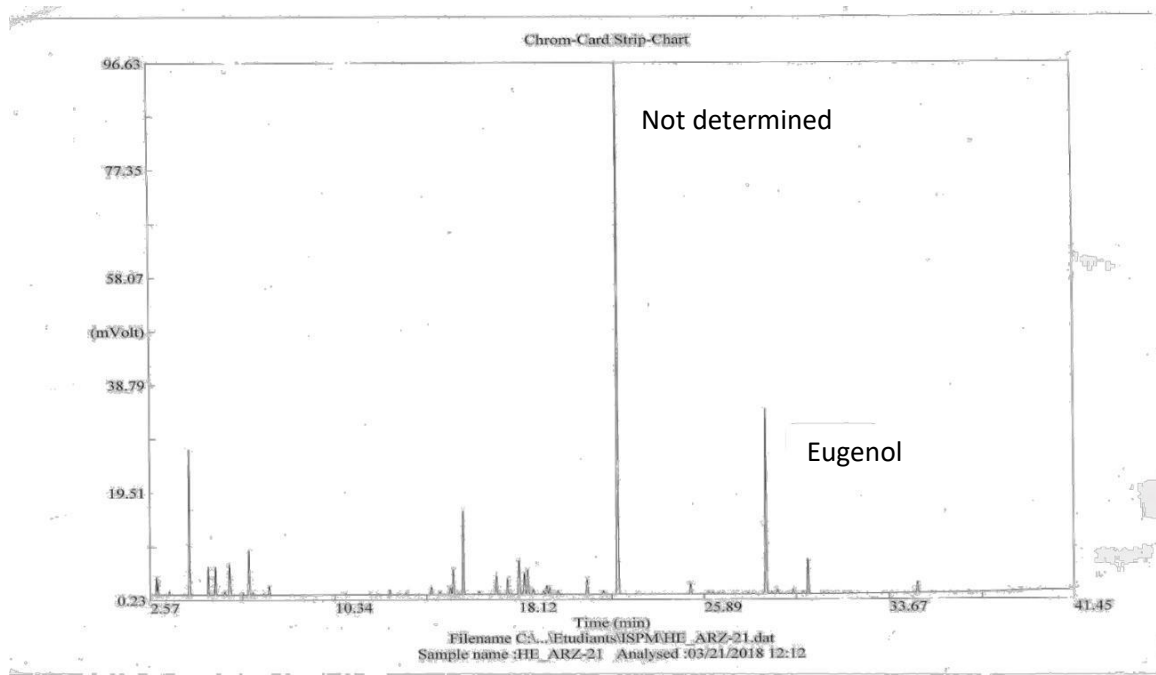


Figure 2. The gas chromatography analysis of *Piper Betle*

References

1. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.021>
2. Fong H.H.S., Tin-Wa M., Farnsworth N.R. Phytochemical screening Plants, Documents of Department of Pharmacognosy and Pharmacology.-University of Illinois, Chicago, 1974.
3. AFNOR. Compendium of French standards on essential oils.-Paris: 4th edition, 1982.

UDC 631.527.1

Application of doubled haploid technology in producing common (bread) wheat with desired starch properties

O. Olajide¹, M. Alkubesi², A. Blinkov², D. Litvinov², M. Divashuk²

¹Moscow Institute of Physics and Technology

²All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology

In the future, our planet will face a significant challenge in providing enough food to feed a growing population, as food production needs to be nearly doubled by 2050. However, the rate of crop yield improvement has slowed down recently. Crop breeding programs and improved management can only lead to relatively small annual yield gains, which must be increased to meet the projected demand by 2050. Therefore, exploring new technologies that will speed up quality food production is essential [1].

The importance of wheat in maintaining worldwide food and nutrition security cannot be overstated, as it provides approximately one-fifth of the world's food calories and protein. Starch is the primary constituent of wheat grain endosperm, comprising around two-thirds of the weight of flour, meaning starch quality significantly impacts wheat-based products. Starch is composed of two glucose polymers: amylose and amylopectin. The amylose concentration (%) is frequently employed to describe starch's physical, chemical, and technological characteristics. The amylose content in cereal endosperm is influenced by the enzymes involved in starch synthesis, particularly the granule-bound starch synthase I (GBSSI) or Waxy protein encoded by the Waxy genes. This enzyme plays a critical role in amylose biosynthesis [2]. The Waxy gene is an essential genetic trait in wheat plants. This gene controls the production of amylose. Breeding wheat lines with an optimal combination of Waxy gene alleles in all sub-genomes is a promising approach to improve bread and bakery product quality.

Doubled haploid production is a valuable biotechnology that can accelerate breeding new wheat varieties by several years through the one-step creation of 100% homozygous plants. This involves creating haploid embryos from microspores *in vitro*, which can then be induced to double their chromosome number to yield fully homozygous doubled haploid plants. Doing so eliminates the need for several years of self-pollination and selection, reducing the time, cost, and labour involved in the breeding process. One of the main advantages of using doubled haploid technology is the ability to produce purebred lines more quickly, which can lead to the development of new wheat varieties with improved traits such as yield and disease resistance. Also, this technology has facilitated the development of new wheat varieties better adapted to various environmental conditions [3,4].

This research utilized the anther culture method for the improvements of wheat by creation of a wheat line with a specific (optimized) combination of Waxy gene alleles in all three wheat genomes (A, B and D). Four different hybrids F₁ of winter wheat (donor plants) developed by crossing parent plants with different Waxy alleles were grown in the field: 70-12Mc 5 × 58-12Mc 2-3, 70-12Mc 12 × 58-12Mc 2-3, 71-12Mc 13 × 58-12Mc 2-3 and 71-12Mc 11 × 58-12Mc 2-3. The wheat spikes were surface sterilized and the anthers were cultured on a 190-2 medium supplemented with 2 mg/L 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0.5 mg/L kinetin. The Petri dishes containing anthers were incubated at 28°C for six weeks. Callus and embryo derived from microspores were cultured on a 190-2 medium supplemented with 0.5 mg/L kinetin and 0.5mg/L 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) for regeneration into plantlets. These plantlets were adapted to a hydroponic system for further growth. The determination of the ploidy level was carried out using the CyFlow Space (Sysmex, Germany). The diploid plants were transferred to pots containing soil and kept in a Growth Chamber Fitotron SGC 120 (Weiss Technik, Netherlands) to grow into multiple tiller plants. At the same time, haploid plantlets were treated with colchicine for 8 h to induce chromosome doubling. The genotyping of Waxy allele was done using PCR and Gel Electrophoresis with primers according to Klimushina et al. [5]. These plants were transferred to the vernalization room to stimulate normal development into mature plants, as work is being done on winter wheat.

We obtained 185 plantlets from the anther culture: 125 albino plants and 60 green plants. At the end of the process, there were 46 surviving plants: Mc 5 × Mc 2-3 (27 plants); Mc 12 × Mc 2-3 (3 plants); 71Mc 13 × Mc 2-3 (3 plants); 71-12Mc 11 × Mc 2-3 (13 plants). The flow cytometry analysis shows that the 46 surviving plants have different ploidy levels: 25% haploids, 12% aneuploidy and polyploidy plants, and 63% diploids. PCR and electrophoresis analysis shows homozygosity of allele combinations in the three subgenomes of Waxy wheat. Thus, we were able to generate pure homozygous line from the four different hybrids F₁ of winter wheat. After the vernalization process and seeds retrieval from the wheat plant, our plans include the analysis of the seed endosperm for starch content to verify that these lines are ideal for future wheat varieties development. The pure lines generated will be a valuable material for breeders to create new wheat cultivars with grains of the specific valuable quality.

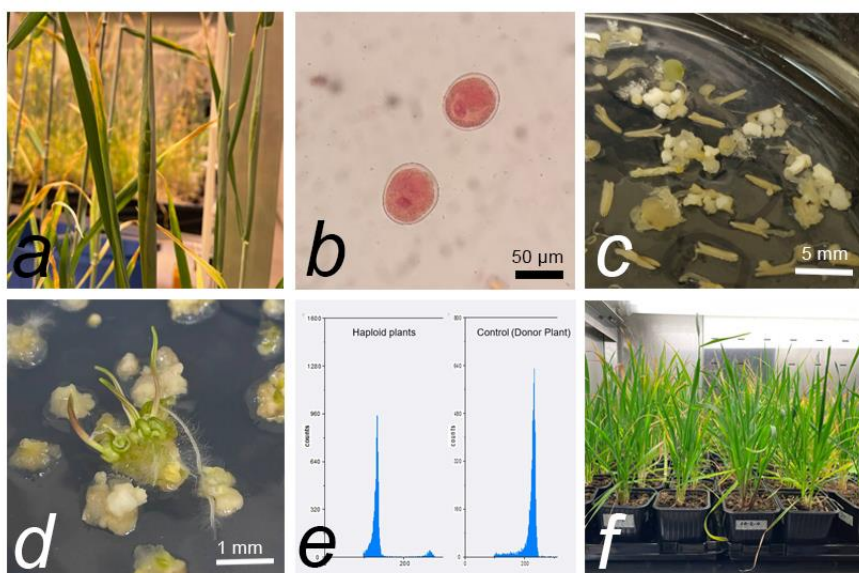


Figure 1. Different steps involved in the doubled haploid production: a. Spike from which microspore is isolated b. Microspore at the mid-to late- uninucleate stage c. Callus and embryo formation after six weeks

of anther culture d. Shoot regeneration from embryo e. Graphical Representation of flow cytometry analysis (left: haploid, right: control-donor plant) f. Wheat plants at the vernalization room.

References

1. Wijerathna-Yapa A., Ramtekey V., Ranawaka B., Basnet B.R., Applications of In Vitro Tissue Culture Technologies in Breeding and Genetic Improvement of Wheat. *Plants*, 11, no 17 (2022).
2. Klimushina M.V., Kroupin P.Y., Bazhenov M.S., Karlov G.I., Divashuk M.G., Waxy Gene-Orthologs in Wheat × Thinopyrum Amphidiploids. *Agronomy*, 10, no. 7 (2020).
3. Eliby S., Bekkuzhina S., Kishchenko O., Iskakova G., Kylyshbayeva G., Jatayev S., Soole K., Langridge P., Borisjuk N., Shavruko Y. Developments and prospects for doubled haploid wheat. *Biotechnology advances* (2022).
4. Matial P., Chaudhary H.K., Sharma N., Gangwar O.P., Kishore N., Dharam P., Pramanick K.K., Bhardwaj S.C., Chauhan R. Developing genetic stock for yellow and brown rust resistance in Triticum aestivum L. via Imperata cylindrica-mediated doubled haploidy technique. *Cereal Research Communications*, 50, no. 5 (2021)
5. Klimushina M.V., Gladkih N.I., Divashuk M.G., Bepalova L.A., Vasilyev A.V., Karlov G.I. Distribution of allelic variants of wx genes in the common wheat collection made at the Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 16, no. 1 (2012).

УДК 575.117.2

Транскриптомный анализ растений *Vicia cracca*, произрастающих на территории зоны отчуждения черновыльской АЭС

В.С. Воронежская¹, М.С. Подлуцкий¹, Е.А. Казакова¹, Е.М. Шестерикова¹, П.Ю. Волкова²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии

²Независимый исследователь, Гел, Бельгия

Травянистые растения, произрастающие в условиях хронического радиационного воздействия, являются перспективным объектом для изучения механизмов адаптации к многолетней антропогенной нагрузке. Транскриптомный анализ является одним из подходов к выявлению кандидатных генов, обуславливающих устойчивость растений к неблагоприятным условиям.

На территориях зоны отчуждения Чернобыльской АЭС произрастают популяции горошка мышиного (*Vicia cracca* L.). Это многолетнее травянистое растение семейства Бобовые, которое является ценной кормовой культурой, содержащей много белка. Используется для залужения неудобий и бросовых земель, а также для сенокосно-пастбищного использования.

Образцы листьев были отобраны на территориях с различным уровнем радиационного загрязнения. Были выбраны два слабозагрязненных (контрольных) участка: Бабчин (В, поглощенная доза 0.29 мкГр/ч), Ломыш (L, поглощенная доза 0.27–0.61 мкГр/ч), и два участка с повышенным радиационным фоном: Кулажин (К, поглощенная доза 1.5–5.0 мкГр/ч) и Масаны (М, поглощенная доза 8.0 мкГр/ч).

Для анализа транскриптомных данных была проведена оценка качества полученных прочтений: оценено качество прочтений в формате phred 33, GC-состав и загрязнение техническими последовательностями. Оценка качества была выполнена с использованием программного обеспечения FastQC v.0.11.9 и MultiQC v.1.10. Для триммирования прочтений использовали программное обеспечение Trimmomatic v.0.40 [1].

Была проведена сборка транскриптома *de novo*, используя ассемблер Trinity v.2.9.1 [2] на бесплатной открытой платформе Galaxy/Europe [3]. В результате была получена сборка транскриптома, состоящая из 1 217 358 контигов, собранных в кластеры из 652 040 «генов». Парные и непарные прочтения, выравненные обратно на собранный транскриптом программой Bowtie2 [4], показали высокий процент выравнивания (> 95%). В программном обеспечении BUSCO v.5.4.3 [5] было проведено сопоставление ожидаемых генов транскриптома с линией fabales. В результате было сопоставлено 89,4% ортологов.

Для собранных контигов было проведено предсказание открытых рамок считывания в TransDecoder v.5.5.0. Поиск белковых (blastp) и транслирующих (blastx) мотивов осуществлялся на последовательностях, полученных из базы данных Swiss-Prot. Функциональная аннотация была проведена в Trinotate v.3.2.2 [6].

Для количественного определения генной экспрессии использовался алгоритм квантификации kallisto v.0.46 [7]. Полученные результаты анализировали пакетом статистики R DESeq2 [8]. Сравнение производили между опытными и контрольными участками, а также между двумя контрольными

участками (Бабчин-Ломыш) для оценки гетерогенности (рис. 1). Для оценки дифференциальной экспрессии генов были отобраны результаты, соответствующие условиям:

где p -adjusted – это значение p -value, скорректированное методом Бенджамини-Хохберга [9].

В результате были определены гены, экспрессия которых однонаправленно изменялась относительно обоих контрольных участков и не различалась между двумя контролями (Бабчин и Ломыш). Всего было отобрано 457 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) с пониженной и 371 ген с повышенной регуляцией. Инструментом для аннотаций DAVID Bioinformatics [10] были определены значимые термины генной онтологии для генов с повышенной и пониженной регуляцией.

Среди ДЭГ с пониженной регуляцией в качестве потенциальных генов интереса были определены гомологи генов, участвующих в синтезе крахмала, процессах гликолиза, фотосинтеза, биосинтеза хлорофилла и метаболизма тиамина. Среди ДЭГ с повышенной регуляцией отобраны гомологи генов, участвующих в индукции апоптоза, антиоксидантной активности, репарации ДНК и трансдукции сигналов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-74-10004)

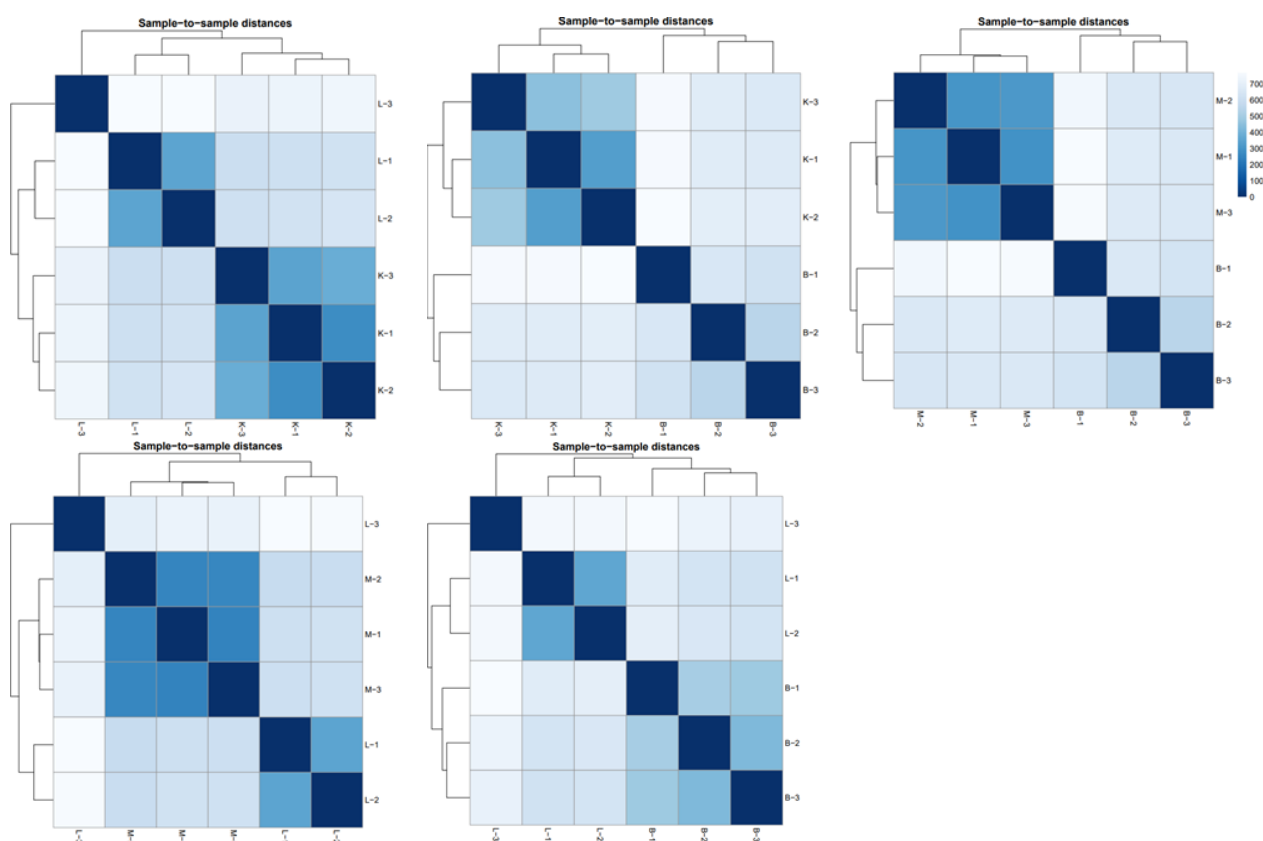


Рисунок 1. Тепловая карта расстояний между образцами (Ломыш-Кулажин, Бабчин-Кулажин, Бабчин-Масаны, Ломыш-Масаны, Ломыш-Бабчин)

Литература

1. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. № 15 (30). P. 2114–2120.
2. Grabherr M.G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome // *Nature Biotechnology*. 2011. № 7 (29). P. 644–652.
3. Jalili V. et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update // *Nucleic Acids Research*. 2020. № 14 (48). P. 8205–8207.
4. Langmead B. et al. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors // *Bioinformatics*. 2019. № 3 (35). P. 421–432.
5. Manni M. et al. BUSCO Update: Novel and Streamlined Workflows along with Broader and Deeper Phylogenetic Coverage for Scoring of Eukaryotic, Prokaryotic, and Viral Genomes // *Molecular Biology and Evolution*. 2021. № 10 (38). P. 4647–4654.
6. Bryant D.M. et al. A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors // *Cell Reports*. 2017. № 3 (18). P. 762–776.
7. Bray N.L. et al. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification // *Nature Biotechnology*. 2016. № 5 (34). P. 525–527.

7. *Love M.I., Huber W., Anders S.* Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biology*. 2014. № 12 (15). P. 550.
8. *Benjamini Y., Hochberg Y.* Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing // *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. 1995. № 1 (57). P. 289–300.
9. *Sherman B.T.* et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update) // *Nucleic Acids Research*. 2022. № W1 (50). P. W216-221.

УДК 578.7

Регуляция разделения фаз нуклеокапсидного белка SARS-CoV-2 с вирусной РНК посредством соединений-модуляторов *in vitro*

Е.К. Книжник¹, Ю.И. Светлова², А.М. Варижук², А.В. Аралов³, В.А. Манувера², Е.С. Матюгина⁴.

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства

³Институт биоорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

⁴Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН

В процессах трансляции и упаковки вирусных частиц SARS-CoV-2 особую роль играет внутриклеточное разделение фаз типа “жидкость-жидкость” (liquid-liquid phase separation, далее - LLPS) с образованием динамичных РНК-белковых ассоциатов “капля в жидкости”. Описанные структуры формируются за счет множественных неспецифических взаимодействий неструктурированных участков белка [1] (IDR, intrinsically disordered region), а также специфических взаимодействий N-концевого домена с РНК и С-концевых димеризационных доменов друг с другом. LLPS участвует в процессе блокирования иммунного ответа клетки вирусом, а также влияет на сборку вирусного капсида. Известны последовательности РНК [2] способствующие эффективному образованию конденсатов, за счёт взаимодействия с нуклеокапсидным (N) белком. Однако механизм образования капель, а также способы влияния на него, пока остаются до конца не изученными. Поэтому поиск соединений, влияющих на образование конденсатов, в частности ингибиторов LLPS SARS-CoV-2 особенно актуален.

В данной работе в бесклеточной системе были реконструированы и визуализированы методом флуоресцентной микроскопии конденсаты N-РНК [3] с использованием флуоресцентно меченого рекомбинантного белка N и синтетических олигонуклеотидов (фрагментов вирусного генома). В полученной модельной системе нами была охарактеризована чувствительность LLPS к внешним условиям (рН, температура, ионная сила), что позволило уточнить механизм формирования конденсатов. Также был выполнен скрининг регуляторов LLPS – протестированы прототипы противовирусных препаратов, выбранные на основе их предполагаемой способности конкурировать с РНК за конкретные N-сайты или вмешиваться в неспецифические взаимодействия π - π /катион- π и исследована чувствительность LLPS к внешним факторам (рН, температура, ионная сила). Набор потенциальных модуляторов LLPS [4] включал флексимеры, 5'-норкарбоциклические и перилен-содержащие нуклеозидные аналоги, а также ненуклеозидные амфифильные и гидрофобные производные перилена.

Большинство из противовирусных препаратов усиливали образование конденсатов N-РНК. Было установлено, что гидрофобные производные перилена проявляют соответствующее влияние на LLPS лишь в модельных системах, в то время как 5'-норкарбоциклические производные нуклеозидов перспективны для нацеливания на вирусные конденсаты в клетках [5]. Однако, ввиду значительной токсичности последних, необходимы дальнейшие исследования их взаимодействия со стрессовыми гранулами и другими немембранными органеллами клетки-хозяина.

Полученные результаты [5] показывают, что электростатические взаимодействия РНК с N-белком, наряду с гидрофобными взаимодействиями N-N, вносят вклад в формирование конденсатов, и этот процесс можно регулировать низкомолекулярными нуклеотидными и полиароматическими лигандами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации № МД-5000.2022.3

Литература

1. Savastano A. *et al.* Nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 phase separates into RNA-rich polymerase-containing condensates. // Nat. Commun. 2021, V. 11 P. 6041.

2. Cubuk J. *et al.* The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA // Nat. Commun. 2021, V. 12 P. 1936.
3. Roden C.A. *et al.* Double-stranded RNA drives SARS-CoV-2 nucleocapsid protein to undergo phase separation at specific temperatures. // bioRxiv 2021 V. 14 P. 8168.
4. Matyugina E.S. *et al.* Evaluation of the Antiviral Potential of Modified Heterocyclic Base and 5'-Norcarbocyclic Nucleoside Analogs Against SARS-CoV-2 // Ac. Natur. 2021 V. 13 P. 78.
5. Svetlova J. *et al.* Nucleoside Analogs and Perylene Derivatives Modulate Phase Separation of SARS-CoV-2 N Protein and Genomic RNA In Vitro // Int. J. Mol. Sci. 2022 V. 23, P. 15281.

UDC 577

Improving the efficiency of directed differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes

Walaa Ahme

Moscow Institute of Physics and Technology

Cell-based therapies offer a viable treatment option for the treatment of heart failure (HF) due to their potential to regenerate damaged cardiomyocytes and restore endogenous tissue [1]. Current treatments, such as interventional, surgical approaches and cardiac ablation, are incapable of replacing lost cardiomyocytes, while a heart transplant is limited by donor availability and immunosuppressive concerns. As a result, the development of novel strategies has been necessary to inhibit and reverse cardiac dysfunction.

The aim of this study is to develop protocols for the isolation of patient-specific MSCs and consequently targeted differentiation of MSCs into cardiomyocytes based on paracrine effect.

To solve these problems, human iPSCs and MSCs were used in the work. Protocols for MSC isolation from human bone marrow biopsy were developed and modified. The isolation of MSCs from human bone marrow is based on centrifugating bone marrow and trypsinization bone tissue. MSC cell lines have been obtained successfully from patients aged 35-70 years. Substrates for optimal cultivation and differentiation of MSCs were tested, such as: Matrigel (Matrigel - LDEV-FREE, MATRIGEL® CORNING,), gelatin, Geltrex and others. Matrigel proved to be the best substrate, as MSCs reached essential confluency (80-90%) being cultured on this substrate faster. One protocol for differentiation from MSCs to cardiomyocytes was obtained using factors derived from parallel differentiation of iPSCs to cardiomyocytes with a yield of about 10%. MSC-derived cardiomyocytes were characterized with the help of immunostaining method. Further, this protocol will be improved to increase the yield of cardiomyocytes.

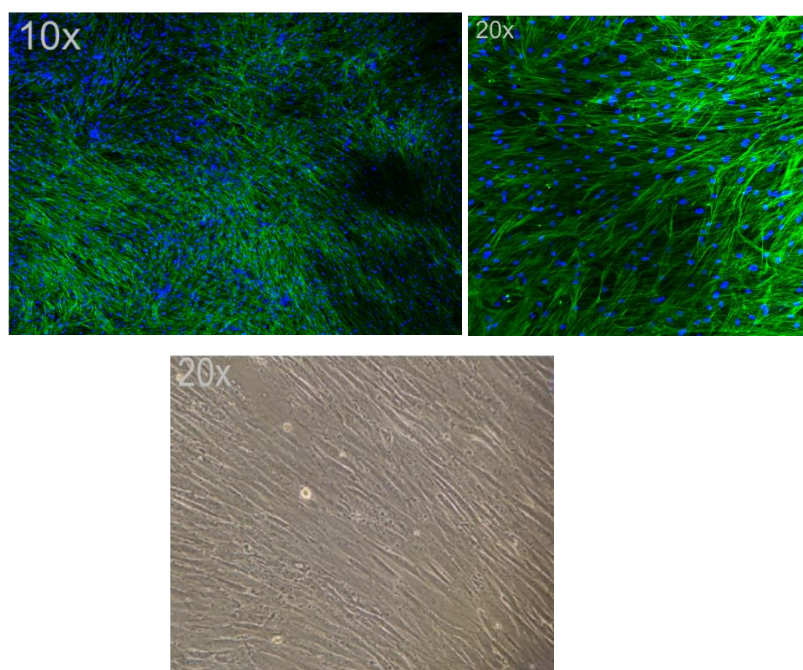


Figure 1. Immunocytochemical staining of cultured human bone marrow-derived mesenchymal stem cells stained with fluorophore-conjugated antibodies provided in the kit. Nuclei of the cells were visualized with DAPI (blue).

F-actin staining was present on human mesenchymal stem cells and appears green.

References

1. Berliner D., Hänselmann A., Bauersachs J. The treatment of heart failure with reduced ejection fraction. *Deutsches Arzteblatt International*, (2020) 117(21), 376–386. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2020.0376>

УДК 61

Безопасность и эффективность применения препарата АВИАНДР® у пациентов с генерализованным тревожным расстройством: многоцентровое, рандомизированное, двойное-слепое, плацебо-контролируемое, сравнительное исследование III фазы

Е.А. Щербинина^{1,2}, А.С. Тараканова², Е.В. Якубова³

¹Московский Физико-технический институт (национальный исследовательский институт)

²ООО «НИИ ХимРар»

³ООО «ХимРар Фарма»

В ГК «ХимРар» разработан новый лекарственный препарат АВИАНДР® [1, 2], который обладает мультитаргетной активностью, в частности, способностью ингибировать адренергические, дофаминовые, серотониновые и гистаминовые рецепторы, что обуславливает наличие анксиолитических и антидепрессивных свойств у препарата. В проведенных ранее клинических исследованиях была продемонстрирована эффективность препарата при тревожных состояниях, в том числе при генерализованном тревожном расстройстве, и тревоге, возникающей, как следствие новой коронавирусной инфекции.

Главной задачей исследования (первичной конечной точкой) являлась оценка эффективности препарата АВИАНДР® по сравнению с Плацебо и препаратом Афобазол® на основании изменения общего балла по структурированному интервью шкалы Гамильтона для оценки тревоги (SIGN-A) на неделе 8 относительно исходного значения. Дополнительной целью была оценка различных параметров эффективности (вторичных конечных точек) и безопасности препарата АВИАНДР® по сравнению с Плацебо и препаратом Афобазол® у пациентов с ГТР в течение 8 недель исследуемой терапии, а также в течение 24 недель последующего лечения препаратом АВИАНДР® в открытом периоде долгосрочной терапии и через 4 недели после завершения приема исследуемого препарата: частота снижения общего балла по структурированному интервью шкалы Гамильтона для оценки тревоги (SIGN-A) на 50% и более от исходного значения, изменения общего балла и суммы баллов по шкалам SIGN-A, MADRS, ВАШ, SDS, SF-20, доля пациентов, достигших медикаментозной ремиссии (сумма баллов по SIGN-A ≤ 7), изменение общего клинического впечатления о состоянии (CGI-S), общее клиническое впечатление о динамике состояния (CGI-I), изменение показателей выполнения ТМТ-теста (время выполнения) относительно исходного значения.

Было проведено многоцентровое рандомизированное сравнительное исследование, состоящее из следующих периодов: скрининга, вводного периода, периода исследуемой терапии (сравнительный этап и открытый несравнительный этап) и наблюдения. Исследование имело двойной-слепой дизайн для препарата АВИАНДР® и Плацебо, заслепления для препарата Афобазол® не проводилось. Пациенты были рандомизированы в три группы: группа 1 принимала АВИАНДР® (n = 120), группа 2 – Плацебо (n = 40), а группа 3 – Афобазол® (n = 40). Исследуемый препарат (АВИАНДР®) назначался по 20 мг два раза в день, плацебо – два раза в день, препарат Афобазол® назначался по 10 мг три раза в день.

Исследование показало, что в группе 1 статистически значимое среднее изменение общего балла по шкале SIGN-A составило -12.0 ± 7.6 , в группе 3: -11.3 ± 6.5 , а в группе 2: -8.2 ± 6.2 . Различие между группами 1 и 2 является значимым, так как величина р-критерия по результатам двустороннего теста составила 0.006 ($p < 0.050$). При этом 95%-й доверительный интервал оказался в диапазоне значений от -6.45 до -1.07 (верхняя граница 95% ДИ менее 0). Следовательно, можно сделать вывод о превосходстве препарата АВИАНДР® над Плацебо в отношении симптомов тревоги у пациентов с ГТР. По результатам анализа вторичных конечных точек можно отметить, что наибольшее количество статистически значимых изменений наблюдалось в группе терапии препаратом АВИАНДР®. Таким образом, препарат АВИАНДР® обладает эффектом, статистически и клинически превосходящим эффект Плацебо, и является эффективным в отношении редукции тревоги у пациентов с ГТР.

Литература

1. Ivashchenko A.A., Morozova M.A., Vostokova N.V., Beniashvily A.G., Bukhanovskaya O.A., Burminskiy D.S., Egorova A.N., Gluskina L.Y., Gorchakov D.S., Karapetian R.N., Kasimova L.N., Kravchenko D.V., Lepilkina T.A., Merkulova E.A., Mitkin O.D., Penchul N.A., Potanin S.S., Rupchev G.E., Ivachtchenko A.V. Safety and efficacy of aviandr in patients with generalized anxiety disorder: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, pilot study//Journal of Psychiatric Research, 2021, Vol. 143, Safety and efficacy of aviandr in patients with generalized anxiety disorder, P. 436-444.

2. Иващенко А.В. и др. Замещенные 2,3,4,5-ТЕТРАГИДРО-1Н-ПИРИДО[4,3-*b*]ИНДОЛЫ, способ их получения и применения// Патент на изобретение RU2334747C1 -: опубликовано: 27.09.2008. заявка N 2007112666/04.

УДК 577.22

Роль G-квадруплексов в формировании транскрипционных хабов с ВЕТ-белками

М.С. Юдин^{1,2}, А.М. Варижук^{1,2}, Ю.И. Павлова^{1,2}, Д.В. Клинов^{1,2}, В.Б. Цветков²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М.

Лопухина Федерального медико-биологического агентства

G-квадруплексы (G4) - неканонические вторичные структуры гуанин-богатых нуклеиновых кислот. G4 широко представлены в транскрипционно-активных участках генома и ориджинах репликации, при этом их персистенция затрудняет репликацию и транскрипцию [1]. Опухолевые клетки отличаются системным нарушением транскрипции, в том числе избыточно активной транскрипцией. Для этого феномена есть несколько причин, одной из них считается повышение экспрессии специфических к гиперацетилюванному хроматину ВЕТ-белков. Ключевой белок семейства ВЕТ – BRD4 инициирует сборку транскрипционных хабов в местах энхансер-промоторных взаимодействий. Наиболее явно это проявляется в суперэнхансерах (SE) и реализуется по механизму разделения фаз (LLPS) [2]. Ранее нами было показано, что помимо ацетилюванных гистонов ВЕТ-белки способны связывать модельные G4-олигонуклеотиды. Остался открытым вопрос, формируются ли G4 в составе хроматина в SE и способны ли они привлекать BRD4. Поскольку ВЕТ-белки являются перспективными мишенями эпигенетической терапии, прояснение механизма их конденсации в суперэнхансерах является актуальной задачей.

Для проверки возможности формирования G4 в нуклеосомном окружении были разработаны конструкции двухцепочечной ДНК длиной 226 п.н., состоящие из ранее охарактеризованной последовательности позиционирования нуклеосом длиной 147 п.н. с фланками по 10 п.н. и линкерной ДНК случайной последовательности или содержащей G4. Для получения конструкций были фосфорилированы и лигированы синтетические дуплексы А-D/Дс длиной 55/56 п.н. Дуплексы А-С составляли последовательность позиционирования нуклеосомы, в то время как дуплексы D и Дс представляли линкерные ДНК с G4 и без G4 соответственно.

Наличие фолдированного квадруплекса в целевой конструкции из фрагментов А-D подтверждали с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД). Фрагменты В и С показали спектры КД, подобные Дс и типичные для В-формы ДНК с положительными и отрицательными полосами при 280 и 240 нм соответственно. В случае D максимум был сдвинут в область 265 нм, что указывает на наличие в составе дуплекса G4. Спектр фрагмента А напоминал спектр D и был интерпретирован как сигнатура метастабильного (“слабого”) G4.

Для подтверждения G4-фолдинга в фрагментах А и D конструкций был проведен ¹H-ЯМР-анализ. Фрагмент линкерной ДНК Дс без G4 использовали в качестве отрицательного контроля. Области иминовых протонов во всех спектрах содержали две четко выраженные группы сигналов около 12-13 мд и 13-14 мд. Такие химические сдвиги характерны для гуаниновых (G-H1) и тиминовых (T-H3) иминовых протонов, образующие участвующих в образовании уотсон-криковской водородной связи. Дополнительные уширенные сигналы иминовых протонов малой и умеренной интенсивности были видны между 10 и 12 м.д. в спектрах А и D соответственно; в спектре Дс они отсутствовали. Такие сигналы типичны для протонов, образующих хугстиновские водородные связи. Таким образом, данные спектроскопии ЯМР подтвердили наличие слабого G4 непосредственно возле сайта позиционирования нуклеосомы (А) и более устойчивого G4 в линкерной ДНК D. Рассчитанные доли фолдированных G4 составили 47% для D и 10-15% для А.

Сборку нуклеосом на конструкциях А-D/Дс, а также на контрольной ДНК проводили путем последовательного разбавления растворов ДНК-гистоновых смесей с высокой ионной силой, а результаты анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). При

эквимольном соотношении октамеров гистонов и ДНК нуклеосомы склонны к скольжению, о чем свидетельствовали диффузные полосы в ПААГ. Умеренный избыток гистонов уменьшал скольжение и увеличивал выход нуклеосом. Выход конструкции без квадруплекса (A-Dc) был выше, чем с G4-линкером (A-D).

Исследования методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) подтвердили сборку нуклеосом на всех конструкциях ДНК. Нуклеосомы визуализировались как зерна высотой примерно 4 нм, а их видимый радиус составлял около 6 нм. В соответствии с морфологией конструкций в большинстве случаев из ядра нуклеосомы выступал один «хвост» ДНК, а сравнение длин «хвостов» D и Dc подтвердило наличие G4 в D.

Была показана применимость нуклеосомной модели для исследования селективности лигандов G4 с использованием известных контрольных лигандов PDS, TmPyP4 и BRACO-19. В соответствии с литературными данными [3], PDS продемонстрировал наибольшую селективность, в то время как BRACO разбирал нуклеосому при средних микромолярных концентрациях. В целом разрушающие нуклеосому свойства лигандов, вероятно, коррелируют с их сродством к дуплекам. Однако возможны и прямые взаимодействия с нуклеосомой. Эти данные указывают на вероятные побочные эффекты G4-лигандов и подчеркивает важность учета хроматинового контекста при использовании геномных G4 в качестве мишеней терапевтических агентов. Основным результатом работы с нуклеосомной моделью можно считать подтверждение формирования G4 в линкерных (межнуклеосомных) участках. Разработанная модель открывает возможности анализа взаимодействий G4 и транскрипционных факторов с учетом хроматинового контекста, что особенно важно в случае ВЕТ-белков и G4-богатых гиперацетилированных SE.

G4-богатые SE существенно варьируются в зависимости от клеточной линии. Мы рассмотрели 2 опухолевые линии: K562 (миелоидный лейкоз) и A549 (аденокарцинома легкого), а также условно-нормальную линию HEK293. Были использованы данные ChIP-seq с анти-G4 антителами для выбранных клеточных линий, и в каждой было выделено по 20 G4-богатых SE. Координаты SE были получены из БД SEdb 2.0. Координаты G4-seq-и ChIP-seq пиков были получены из Gene Expression Omnibus. Характерные для SE мотивы и конкретные последовательности G4 выделяли с использованием алгоритмов MEME и FIMO. Итоговые G4 были синтезированы в виде коротких одноцепочечных олигонуклеотидов. Для анализа взаимодействий с BRD4 были отобраны характерные G4 SE параллельной (pG4) и антипараллельной (aG4) топологии. Первичная проверка связывания была выполнена методом поверхностного плазмонного резонанса. Было подтверждено сродство BRD4 к pG4 SE. Для более корректной оценки связывания в хроматиновом контексте требуются дальнейшие исследования с использованием аналога вышеописанной нуклеосомной модели с ацетилированными гистонами и pG4 SE в линкерном участке. In silico эксперименты указывают на множественные транзитные взаимодействия BRD4 с G4 и ацетилированными гистонами, что согласуется LLPS-механизмом конденсации BRD4 в G4-богатых SE.

Таким образом, предварительные данные подтверждают, что квадруплексы в суперэнхансерах инициируют конденсацию BRD4.

Данное исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 22-15-00129.

Литература

1. Spiegel J., Adhikari S., Balasubramanian S., The Structure and Function of DNA G-Quadruplexes, Trends Chem, 2 (2020) 123-136.
2. Robinson J., Raguseo F, Nuccio S.P., Liano D., Di Antonio M. DNA G-quadruplex structures: more than simple roadblocks to transcription? Nucleic Acids Res. 2021 Sep 7;49(15):8419-8431.
3. R. Rodriguez S. Muller J.A. Yeoman C. Trentesaux J.F. Riou S. Balasubramanian, A Novel Small Molecule That Alters Shelterin Integrity and Triggers a DNA-Damage Response at Telomeres, Journal of the American Chemical Society, 130 (2008) 15758-+.

УДК 57.088.5

Фенотипический отклик раковых клеток A2780 на лекарственное воздействие топотекана с использованием ультракороткого масс-спектрометрического анализа И.И. Федоров^{1,2}, Ю.А. Бубис¹, Д.Д. Емекеева^{1,2}, Е.М. Казакова^{1,2}, М.В. Иванов¹, И.А. Тарасова¹, М.В. Горшков¹

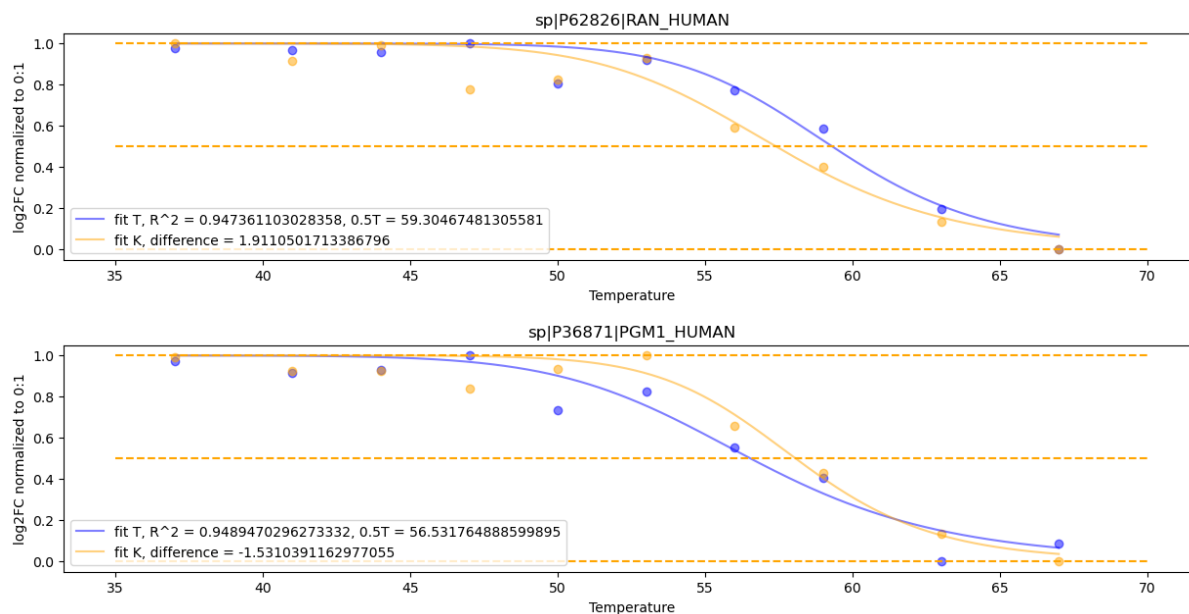
¹ФГБУН Федеральный исследовательский центр химической физики РАН им. Н.Н. Семенова РАН, Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе,

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

При разработке новых лекарственных препаратов важным этапом является определение целевых соединений, с которым лекарство связывается. Эта задача решается методами химической протеомики, среди которых помимо традиционной аффинной хроматографии широко используется масс-спектрометрический протеомный анализ. Среди последних, большой интерес представляют методы так называемой ультракороткой протеомики, позволяющие измерять изменения количественного содержания всех белков клеточных протеомов за несколько минут анализа. Целью данного исследования являлась разработка методики исследования взаимодействия лекарства с белками на основе данных, полученных при использовании метода DirectMS1 [1]. Метод DirectMS1 основан на разделении протеолитических смесей с использованием минутных градиентов ВЭЖХ и идентификации белков напрямую на основе масс-спектров пептидов высокого разрешения, что позволяет ускорить количественный анализ всего протеома более, чем на порядок, по сравнению с традиционными подходами на основе тандемной масс-спектрометрии. На примере клеточной линии рака яичников A2780, обработанной онкопрепаратом топотекан метод DirectMS1 был реализован для идентификации белков-мишеней лекарственного воздействия на основе температурного протеомного профилирования TPP (thermal proteome profiling [2]). Также, задачами работы являлась разработка алгоритмов построения температурных кривых денатурации идентифицируемых белков протеома, на основе которых выявляются мишени лекарственного воздействия в методе TPP, а также подходов к статистическому анализу полученных данных об изменении температуры денатурации белков в результате воздействия. Программная реализация анализа полученных данных осуществлялась с использованием языка программирования Python. Результатом работы разработанного программного обеспечения для обработки и анализа экспериментальных данных являются графики сигмоидальных кривых денатурации для каждого из идентифицированных белков. На рис. 1 представлен пример полученных в работе температурных кривых денатурации белка, кодируемых генами RAN, PGM1, NEUL до и после обработки лизатов клеточной линии препаратом топотекан. Целевые белки лекарственного воздействия выявлялись на основе анализа статистической значимости экспериментально измеряемых изменений точек перегиба температурных кривых белков лизатов клеточной линии A2780 после воздействия. Всего, в результате исследования было выявлено 7 белков, которые предположительно взаимодействуют с топотеканом, в частности белки, кодируемые генами ODO1, NEUL, 5NTC, RAN, PGM1, ALDH2, DHPR.

Таким образом, в работе впервые метод химической протеомики TPP был реализован на основе ультракороткого полнопротеомного анализа DirectMS1. Полученные результаты позволяют существенно сократить затраты инструментального времени для поиска белковых мишеней лекарственного воздействия, что является принципиально важным при разработке новых лекарств, а также выяснении механизмов их действия и предсказания возможных побочных эффектов химиотерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-45-00012).



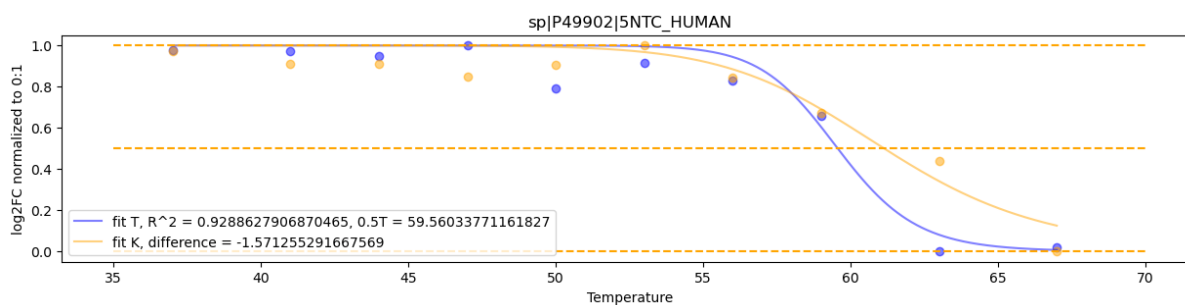


Рисунок 1. Графики сигмоидальных кривых плавления белка, кодируемых генами RAN (ГТФаза, вовлеченная в нуклеоплазматический транспорт, участвующая как в импорте, так и в экспорте из ядра белков и РНК), PGM1 (Этот фермент участвует как в расщеплении, так и в синтезе глюкозы), 5NTC (обладает фосфотрансферазной активностью, благодаря которой может переносить фосфат с донорного нуклеозидного монофосфата на акцепторный нуклеозид, предпочтительно инозин, дезоксиинозин и гуанозин). Ни один из представленных выше белков не имеет прямой связи с известным механизмом действия топотекана, но некоторые функции этих белков могут дать возможность выявления механизмов развития побочных действий при употреблении данного вида лекарства.

Литература

1. *Ivanov M.V. et al.* MS/MS-free protein identification in complex mixtures using multiple enzymes with complementary specificity// *J. Proteome Res.*, (2017) 16, 3989-3999, doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00365.
2. *Savitski M.M. et al.* Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome, *Science*, (2014) 346, 1255784, doi: 10.1126/science.1255784.

УДК 544.173:543.51(043)

Метод метаболического профилирования крови новорожденных на основе прямой масс-спектрометрии

Е.В. Шамарина¹, М.А. Шамраева¹, С.И. Пеков^{1,2}, И.А. Попов¹

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Сколковский институт науки и технологий

Методы анализа, основанные на применении масс-спектрометрии, находят всё большее применение в клинической медицине, поскольку позволяют одновременно детектировать разнообразные биомаркеры за одно измерение. В частности, с использованием тандемной хромато-масс-спектрометрии рутинно проводят неонатальный скрининг на наследственные расстройства метаболизма [1]. Определяемые при этом концентрации аминокислот, гормонов и сахаров в крови служат маркерами различных метаболических отклонений [2]. Так, повышенное отношение фенилаланин/тирозин в крови новорожденных является признаком фенилкетонурии. В целях уменьшения количества стадий и времени анализа представляют интерес разработки прямых методов ионизации, которые дают возможность анализировать биологический объект с минимальной пробоподготовкой.

В данной работе применялся подход с использованием пористого объёмного пробоотборника [3], который позволяет непосредственно с его поверхности производить ионизацию электрораспылением соединений из анализируемой пробы цельной крови. Эксперименты проводились с использованием гибридного масс-спектрометра LTQ XL Orbitrap ETD в режиме детектирования положительных ионов.

Была подтверждена возможность обнаружения карнитина и некоторых протеиногенных аминокислот из крови, а также бутиловых эфиров 20-ти протеиногенных аминокислот, орнитина, карнитина и ацетилкарнитина. Был разработан протокол проведения реакции этерификации напрямую на поверхности пробоотборника с нанесённым образцом, для чего оценивалась эффективность различных дериватирующих смесей (на основе бромбутана или 1-BuOH с HCl или HBr) и способов осуществления дериватизации, были оптимизированы температура и время проведения реакции.

На основании анализа предоставленных ДГБ №1 г.Томска образцов крови новорождённых проводилось сравнение предлагаемого метода: этерификации непосредственно на пробоотборнике, с рутинным протоколом: экстракция аминокислот из сухих пятен крови с этерификацией в растворе [1,4]. В результате анализа пробы вычисляются попарные отношения концентраций аминокислот. Статистической разницы между выборками данных значений, полученных двумя сравниваемыми методами, найдено не было ($p\text{-value} > 0.15$).

Таким образом, был разработан метод метаболического профилирования крови на основе прямой ионизации с использованием пористого объёмного пробоотборника. Было показано, что за счет исключения стадии экстракции и хроматографического разделения, время работы оператора при анализе сокращается в среднем с 1 часа до 15 минут, что делает метод перспективным для применения в массовых исследованиях.

Литература

1. Dietzen D.J., Rinaldo P., Whitley R.J., Rhead W.J., Hannon W.H., Garg U.C., Lo S.F., Bennett M.J. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: follow-up testing for metabolic disease identified by expanded newborn screening using tandem mass spectrometry; executive summary // Clin Chem. 2009 Sep;55(9):1615-26.
2. Fernández-Lainez C., Aguilar-Lemus J.J., Vela-Amieva M., Ibarra-González I. Tandem Mass Spectrometry Newborn Screening for Inborn Errors of Intermediary Metabolism: Abnormal Profile Interpretation // Curr Med Chem. 2012;19(26):4511-22
3. Shamraeva M.A., Bormotov D.S., Shamarina E.V., Bocharov K.V., Peregodova O.V., Pekov S.I., Nikolaev E.N., Popov I.A. Spherical Sampler Probes Enhance the Robustness of Ambient Ionization Mass Spectrometry for Rapid Drugs Screening // Molecules. 2022 Jan 30;27(3):945.
4. Wagner M., Tonoli D., Varesio E., Hopfgartner G. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots // Mass Spectrom Rev. 2016 May-Jun;35(3):361-438

УДК 616.517.8; 615.322

Изучение антимикробной активности сыворотки на основе «вскрытой клетки» *Spirulina platensis* применительно к терапии *Psoriasis vulgaris*

Е.С. Бирюкова, Е.И. Марусич

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Объектом исследования является псориаз обыкновенный (*Psoriasis vulgaris*) – один из наиболее распространенных типов псориаза, в 90% случаев переходящий в хроническую форму бляшечного псориаза [1]. Псориаз обыкновенный является системным иммуноопосредованным воспалительным заболеванием, характеризующимся развитием красных эритематозных, уплотненных, чешуйчатых, зудящих бляшек на коже. В патогенезе данного заболевания роль наследственного и аутоиммунного компонентов имеет доминирующее значение. Поскольку одним из наиболее распространенных осложнений бляшечного псориаза являются бактериальное поражение кожи [2], изучение антимикробной активности сыворотки спирулины имеет большое значение в отношении перспектив ее использования в системной терапии против данного заболевания.

В исследовании использовался лизат клеток *Spirulina platensis* (SP), полученный по инновационной технологии разрушения клеточных стенок микроводорослей, так называемая сыворотка или вскрытая клетка спирулины, содержащая 0.1% ксантовой камеди (E415) для придания сыворотке оптимальной плотности [3]. Разрушение биомассы сине-зеленых водорослей было проведено в ротационном переменном магнитном поле с диапазоном частоты 50-400 Гц. Антимикробная активность SP изучалась без разведения, а также в 2.5-, 5-, 10, 25- и 50-кратном разведении водой. Исследование проводилось на ночных культурах бактерий *Klebsiella pneumoniae* (лабораторный штамм ATCC), *Klebsiella pneumoniae* (клинический штамм 1627), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Acinetobacter baumannii*.

Антимикробная активность различных фракций сыворотки *Spirulina platensis* определялась диско - диффузионным методом. На поверхность агара Мюллера – Хинтона в чашке Петри было нанесено 100 мкл бактериальной суспензии с оптической плотностью 0.1 при OD₆₀₀ по McFarland. Затем на бактериальный монослой помещали диски, содержащие 50 мкл сыворотки в разных разведениях. В качестве позитивного контроля были взяты диски, смоченные раствором антибиотика (доксциклин 100 мкг/мл), а негативного контроля – диски, смоченные водой. Далее чашки Петри с бактериальными культурами и дисками инкубировались в течение 24 часов при температуре 37 °С. Диффузия сыворотки в агар приводила к формированию зоны лизиса – зоны подавления роста бактерий вокруг дисков. Антимикробная активность тестируемой сыворотки оценивалась по диаметру зоны лизиса, выраженному в миллиметрах.

Результаты эксперимента по исследованию антимикробной активности сыворотки *Spirulina platensis* (данные диаметров зон лизиса вокруг дисков в миллиметрах) представлены в таблице 1 и проиллюстрированы на рисунке 1. Полученные данные показали, что антимикробной активностью обладает только сыворотка SP без разведения водой. При этом в случае *Bacillus subtilis* сыворотка показала на 100% и 50% большую эффективность, чем в случае *Klebsiella pneumoniae* ATCC и остальных штаммов бактерий, соответственно. Также, в случае *Klebsiella pneumoniae* 1627 сыворотка SP показала лучшую антимикробную активность, чем положительный контроль доксициклин.

Исследованные штаммы бактерий, характеризующиеся выраженной устойчивостью к широкому спектру антибиотикам, являются наиболее распространенными бактериальными патогенами, вызывающими не только кожных осложнений при псориазе [3], но также широкий диапазон других заболеваний. Поэтому доказательство антимикробной активности сыворотки *Spirulina platensis*, впервые показанное нами в ходе проведенных исследований, является обещающим в отношении перспектив дальнейшего ее изучения в качестве средства борьбы с бактериальными поражениями кожи при псориазе.

Таблица 1. Результаты антимикробной активности сыворотки *Spirulina platensis* против бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* (лабораторный штамм ATCC), *Klebsiella pneumoniae* (клинический штамм 1627), *Acenitobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*. Обозначения: D (SP) – средний диаметр зоны лизиса вокруг диска по 4-м измерениям, содержащего сыворотку *Spirulina Platensis*, D (Dox) – средний диаметр зоны лизиса вокруг диска, содержащего антибиотик доксициклин (позитивный контроль). Данные представлены по 4-м измерениям в 2х повторях.

Исследуемое вещество	Культура бактерий	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1627	<i>Acenitobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SP без разведения	D (SP), мм	12	24	16	12	12	12
	D (Dox), мм	14	30	18,5	11	14	14
SP в 2,5-, 5-, 10-, 25- и 50-кратных разведениях	D (SP), мм	0	0	0	0	0	0
	D (Dox), мм	17	15	14	14	12	14

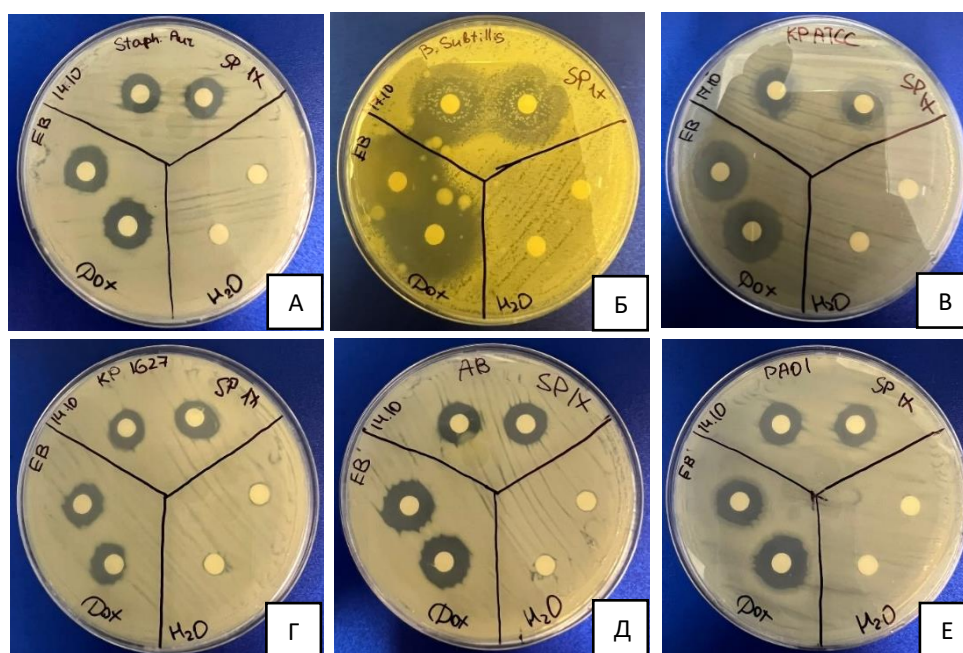


Рисунок 1. Результаты исследования антимикробной активности «вскрытой клетки» *Spirulina platensis* диско – диффузионным методом на культурах *Staphylococcus aureus* (А), *Bacillus subtilis* (Б), *Klebsiella pneumoniae* (лабораторный штамм АТСС) (В), *Klebsiella pneumoniae* (клинический штамм 1627) (Г), *Acinetobacter baumannii* (Д) и *Pseudomonas aeruginosa* (Е).

Литература

1. Griffiths C.E.M., Christophers E.et. al. A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype // British Journal of Dermatology. - 2007. - №156. - С. 258–262.
2. Brook I. Secondary bacterial infections complicating skin lesions// Journal of Medical Microbiology, (2002). 51(10), 808–812. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-10-808>
3. Bendikiene V., Romaskevicius O., Kiriliauskaite V. Method of algal cells disruption and isolation of bioproducts therefrom (World Intellectual Property Organisation Patent) (2014). <https://app.dimensions.ai/details/patent/WO-2014027871-A1>

УДК 571.27

Метод струйной инъекции как способ доставки ДНК-вакцины pVAXrbd в организм мышей

В.А. Яковлев, М.Б. Боргоякова, Д.Н. Кисаков, Л.А. Кисакова

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

ДНК-вакцины привлекают к себе все больше и больше внимания в последние годы благодаря ряду преимуществ: они индуцируют опосредованный Т-клетками и гуморальный иммунитет, имея при этом относительно хороший профиль безопасности; вакцина на основе ДНК представляет собой платформу, которая не индуцирует противовекторный иммунитет, что делает ее подходящей для схем вакцинации, которые включают как прайминг, так и бустеры; производство плазмидной ДНК значительно быстрее и проще, чем производство живых аттенуированных или субъединичных вакцин и является более безопасным, особенно по сравнению с убитыми патогенными вакцинами. Также, ДНК-вакцины могут быть быстро адаптированы к новым мишеням. Но одним из главных препятствий на пути к массовому внедрению ДНК-вакцинации является низкая иммуногенность при введении ДНК в организм в «голом» виде. В связи с этим разрабатывается ряд методов, способствующих проникновению ДНК в организм. К ним относятся катионные полимеры, липосомальные частицы, электропорация [1], струйная инъекция и другие. Использование струйной инъекции в качестве метода доставки ДНК-вакцин выглядит перспективным методом, так как данный метод обеспечивает более широкую дисперсность инъекта в тканях, что приводит к повышению иммуногенности, а также более эффективную доставку в клетки. Результат применения струйного инъектора может варьировать в зависимости от параметров, таких как создаваемое давление, скорость струи, и профиль потока.

Ранее в ГНЦ ВБ Вектор была получена конструкция ДНК-вакцины pVAXrbd, кодирующая рецептор-связывающий домен (RBD) SARS-CoV-2 [2].

Цель исследования – оценка уровня гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных pVAXrbd с помощью метода струйной инъекции.

В работе использовали мышей линии Balb/c весом 16–18 г. Для введения плазмидной ДНК использовали безыгольный инъектор NYALURON PEN XY PLUS, China. Параметры инъектора: скорость струи 220 метров в секунду, давление 6,5 бар, время инъекции 0,33 с. Для снижения болевого синдрома применялся ингаляционный наркоз животных с применением 2,5 % изофлурана. Волосы удаляли с волосистой части лапы с помощью геля для депиляции. Иммунизация проводилась дважды, с интервалом в 35 суток. Мышей иммунизировали в заднюю бедренную мышцу путем внутрикожной инъекции pVAXrbd в дозе 90 мкг в объеме 50 мкл физраствора. В качестве контроля использовалась группа мышей, иммунизированных аналогичной дозой pVAXrbd внутрикожно.

Эффективность доставки pVAXrbd оценивали по определению уровня RBD-специфических антител с помощью ИФА на 14 и 45 сутки. На 14 сутки после иммунизации титры антител в сыворотках животных, иммунизированных pVAXrbd с помощью инъекции, достигали 1:4515, что в 40 раз выше,

чем в группе животных, получивших ДНК-вакцину только в/к с помощью иглы (титры 1:113). На 45 сутки титр антител у мышей, иммунизированных с помощью инжектора, в среднем составил 1:537638. Полученная сыворотка была исследована в тесте вируснейтрализации *in vitro* с использованием штамма SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 и средний титр нейтрализующих антител составил 1:560.

В результате проведенного анализа было выявлено, что использование метода струйной инъекции приводит к существенному увеличению уровня гуморального ответа, по сравнению с классической в/к иммунизацией с помощью иглы. Данное исследование поможет привлечь внимание к струйной инъекции в качестве эффективного метода доставки ДНК-вакцин в организм.

Исследование было выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Литература

1. *Kisakov D.N. et al.* Optimization of In Vivo Electroporation Conditions and Delivery of DNA Vaccine Encoding SARS-CoV-2 RBD Using the Determined Protocol // *Pharmaceutics*. 2022. V. 14. P. 2259.
2. *Borgoyakova M.B. et al.* Self-Assembled Particles Combining SARS-CoV-2 RBD Protein and RBD DNA Vaccine Induce Synergistic Enhancement of the Humoral Response in Mice // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 2188.

УДК 571.27

Использование электропорации для иммунизации мышей ДНК-вакциной конструкции против вируса клещевого энцефалита

Е.В. Тизеева, М. Б. Боргоякова, Д. Н. Кисаков, Е.В. Шабурова, Л. А. Кисакова

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, р.п. Кольцово.

Несколько десятилетий назад ареал распространения вируса касался только регионов средних и северных широт России, а также в странах Центральной, Южной и Северной Европы, Китае и Японии, однако в настоящее время наблюдается стабильная тенденция к появлению очагов вируса клещевого энцефалита в новых неэндемичных регионах и к увеличению числа заболевших. Отмечается, что инфекция принимает все более опасные формы, приводя к тяжелым последствиям или же летальному исходу [1, 2]. В связи с этим, активно ведутся исследования по поиску кандидатных вакцин против вируса клещевого энцефалита [3]. Одно из перспективных направлений – это ДНК-вакцины, обладающие такими преимуществами как способность индуцировать опосредованный Т-клетками и гуморальный иммунитет, безопасность, простота и дешевизна производства. ДНК-вакцины дают возможность создавать конструкции, кодирующие искусственные антигены, содержащие множество Т-клеточных эпитопов.

Ранее в ГНЦ ВБ «Вектор» был спроектирован Т-клеточный полиэпитопный иммуноген AG1, включающий консервативные фрагменты белков ВКЭ, обогащенные множеством потенциальных Т-киллерных и Т-хелперных эпитопов, которые ранее были предсказаны на основе полипротеина вируса клещевого энцефалита. Ген, кодирующий AG1, был клонирован в составе плазмидного вектора pVAX1. Полученная в результате плазида (ДНК-вакцина) была названа pVAX-AG1-ub.

Цель исследования – оценка эффективности ДНК-вакциной конструкции pVAX-AG1-ub, введенной с применением электропорации, в формировании Т-клеточного иммунного ответа.

Для экспериментов по оценке иммуногенности были взяты 3 группы мышей, состоящие из 6 животных. Для снижения болевого синдрома применялся ингаляционный наркоз животных с применением 2,5 % изофлурана. Путем внутримышечной инъекции вводили препарат в заднюю бедренную мышцу мышей и проводили электропорацию по ранее разработанному нами протоколу Мышей иммунизировали двукратно, с интервалом 3 недели по следующей схеме: первая группа - pVAX-AG1-ub в/м по 100 мкг/50 мкл с последующей электропорацией; вторая группа (отрицательный контроль) - pVAX1 в/м по 100 мкг/50 мкл с последующей электропорацией; третья группа (положительный контроль) – внутрибрюшинная инъекция 500 мкл вакцины «Клещ-Э-Вак». Электропорацию проводили с использованием электропоратора CUY21 EDIT II (BEX CO, LTD., Япония) и пинцетного электрода LF 650P5 5 мм (BEX Co., Ltd., Токио, Япония). Протокол

электропорации: постоянный ток прямоугольной формы прямой и обратной полярности с 3 импульсами с напряжением 12 В в течение 30 мс и интервалом 950 мс с ограничением по силе тока в 45 мА.

Анализ эффективности pVAX-AG1-ub, введенной с применением электропорации, в отношении формирования Т-клеточного иммунного ответа проводили на 14 сутки после второй иммунизации с помощью метода ELISpot. Для этого спленоциты выделяли путем индивидуального продавливания селезенки через клеточный фильтр (BD Falcon™, США) с использованием поршня шприца. После удаления эритроцитов с помощью буфера для лизиса эритроцитов (ACK Lysis Buffer, Sigma, США) спленоциты промывали и ресуспендировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 50 мкг/мл гентамицина. Концентрацию клеток определяли на автоматическом счетчике клеток TC20™ (Bio-Rad, США).

Ответ оценивали по способности спленоцитов секретировать интерферон- γ после специфической стимуляции, которую проводили с использованием пула пептидов вируса клещевого энцефалита. В группе, иммунизированной pVAX-AG1-ub+ЭП, среднее количество Т-лимфоцитов, секретирующих IFN- γ , в ответ на стимуляцию вирус-специфическими пептидами, в расчёте на 10^6 спленоцитов, составляло 90; в группе, pVAX1+ЭП, – 4, что указывает на увеличение поствакцинального Т-клеточного ответа при использовании конструкции pVAX-AG1-ub.

Проведенное исследование показало, что Т-клеточный ответ, возникающий в результате иммунизации лабораторных животных полиэпитопной ДНК-вакциной конструкцией pVAX-AG1-ub с применением метода электропорации, значительно выше, чем в контрольной группе, что доказывает иммуногенные свойства данной конструкции.

Исследование было выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Литература

1. Колясникова Н.М. и др. Эволюция клещевого энцефалита за 80-летний период: основные проявления, вероятные причины // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2020. Т. 19. № 3.
2. Kunze M. et al. Recommendations to Improve Tick-Borne Encephalitis Surveillance and Vaccine Uptake in Europe // Microorganisms. MDPI. 2022. V.10. №7.
3. Kubinski M. et al. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Quest for Better Vaccines against a Virus on the Rise // Vaccines. MDPI. 2020. V. 8. № 3. P. 451.

УДК 57.083.3

Гидрогелевый биочип – инструмент определения индекса avidности аутоантител к антигенам ткани щитовидной железы

В.В. Соколова¹, Н.Ф. Нуралиева², М.П. Исаева², Е.Н. Савватеева¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

²Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Министерства здравоохранения Российской Федерации

Распространённой аутоиммунной эндокринной патологией в популяции являются аутоиммунные заболевания щитовидной железы (АИЗ ЩЖ). Характерная особенность данных заболеваний – высокая частота встречаемости аутоантител (АТ) к антигенам ткани ЩЖ среди здоровых лиц, что требует детальной характеристики выявляемых АТ [1]. Предполагается, что АТ состоят из поликлональной смеси с различной avidностью к антигену. Avidность – это суммарная сила всех аффинных взаимодействий между антигеном и АТ с учетом бивалентных и мультивалентных взаимодействий. В настоящее время известно, что с течением заболевания ЩЖ доля пациентов с положительными АТ к тиреопероксидазе и АТ к тиреоглобулину снижается, в то время как доля пациентов с АТ к гормонам щитовидной железы (Т3 и Т4) увеличивается [2]. При этом данные об avidности таких антител с течением заболевания отсутствуют.

Целью работы является создание специализированного биочипа и реализация методики мультиплексного анализа АТ с одновременным определением индекса avidности АТ к каждому из иммобилизованных антигенов ткани ЩЖ и белков-кандидатов. Разработан биочип, содержащий иммобилизованные белки и конъюгаты: тиреопероксидаза, тиреоглобулин, карбоангидраза 2, пируваткиназа, трийодтиронин Т3 (конъюгат с HRP), тироксин Т4 (конъюгат с HRP), пендрин, натрий-йодный симпортер. Процедура анализа включала следующие стадии: инкубацию на биочипе образца сыворотки крови, при этом в элементах биочипа происходило образование комплексов

иммобилизованных антигенов с АТ; добавление хаотропного агента на биочип и детекция неразрушенных комплексов «иммобилизованный антиген - аутоантитело» с использованием флуоресцентно-меченных антивидовых антител против иммуноглобулинов человека класса G. Для определения индекса avidности АТ рассчитывали отношение флуоресцентного сигнала, полученного от каждого антигена при анализе, включающего стадию обработки хаотропным агентом [3], к результату измерения без такой обработки.

Метод апробирован на сыворотках крови здоровых доноров и больных заболеваниями ЩЖ, n=63 (здоровые доноры (n = 26), аутоиммунный тиреоидит (n = 7), диффузный токсический зоб (n = 2), нетоксический многоузловой зоб (n= 2), медулярный рак ЩЖ (n=1), папиллярный рак ЩЖ (n=1), узловые образования ЩЖ n=5, без уточнённого диагноза (n=19)). Обнаружено достоверное различие в медианах индекса avidности для АТ к тиреопероксидазе и Т4 для групп пациентов с заболеваниями ЩЖ и здоровых доноров. Полученное различие имеет практическое значение для оценки рисков развития патологий ЩЖ у здоровых лиц - носителей АТ к тиреопероксидазе и к гормонам ЩЖ.

Работа выполнена при поддержке гранта Фонда научно-технологического развития Югры № 2022-05-01/2022.

Литература

1. Prummel M.F., Wiersinga W.M. Thyroid peroxidase autoantibodies in euthyroid subjects // Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2005. V. 19(1). P. 1–15.

2. Ruggeri R.M., Galletti M., Mandolfino M.G. Aragona P., Bartolone S., Giorgianni G., Alesci D., Trimarchi F., Benvenega S. Thyroid hormone autoantibodies in primary Sjögren syndrome and rheumatoid arthritis are more prevalent than in autoimmune thyroid disease, becoming progressively more frequent in these diseases // Journal of Endocrinological Investigation. 2002. V. 25(5). P. 447–454.

3. Correa V.A., Rodrigues T.S., Portilho A.I., Trzewikowski de Lima, G., De Gaspari E. Modified ELISA for antibody avidity evaluation: The need for standardization // Biomedical Journal. 2021. V. 44(4). P. 433–438.

УДК 577.212.3

Методика создания кДНК библиотеки генов Т-клеточных рецепторов для профилирования пациентов с болезнью Крона

К.В. Сикамов¹, А.Ю. Горбачев^{1,2}.

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²ФГБУ ФНКЦ ФХМ им Ю.М. Лопухина ФМБА России

Болезнь Крона (БК) – это заболевание, которое обуславливается воспалительными процессами слизистой оболочки кишечника. Известно, что это мультифакторное заболевание, которое связано с изменением бактериального состава с одной стороны, и аутоиммунным ответом с другой, заключающимся в том, что Т-клетки иммунной системы начинают атаковать здоровые клетки организма. В исследовании [1] было показано, что среди всех вариантов Т-клеток у пациентов с болезнью Крона, можно выделить особую группу клонотипов, то есть Т-клеток – обладающих специфической последовательностью нуклеотидов в генах Т-клеточных рецепторов (TCR), а именно CDR3 региона последовательности мРНК, – ответственных за аутоиммунную составляющую болезни Крона.

Для исследования клонотипов Т-клеток в образцах периферической крови и биоптатах пациентов с БК была разработана панель для целевого обогащения кДНК последовательностями генов Т-клеточных рецепторов для технологии секвенирования MGISEQ. Процесс приготовления кДНК библиотеки [2] начинается с выделения моноклеарных клеток (включающих лимфоциты), из которых выделяется РНК при помощи тризола.

Далее, подготовленные образцы РНК, используются в качестве матрицы для синтеза кДНК во время обратной транскрипции. На данном этапе осуществляется синтез первой цепи кДНК при помощи Mint-reverse транскриптазы (“Евроген”), сайт посадки которой определяется специфическими последовательностями олигонуклеотидов, которые комплементарно гибридизуются в С-домене TCR генов (“C0” на рис. 1).

Затем, используется последовательность, состоящая из четырех – немодифицированных гуанозинов и одного – “заблокированного” гуанозина (“rGrGrG+G” на рис. 1), которая гибридизуется с дезоксирибонуклеотидами, добавленными вне матрицы РНК в силу особенности Mint-ревертазы, а именно ее способности после завершения синтеза молекулы кДНК, внематрично присоединять к ее 3'-концу от 3 до 5 цитозинов. Помимо этого, данный олигонуклеотидный праймер, содержит уникальный молекулярный идентификатор, используемый для внесения метки в транскрипты (“UMI” на рис.1), а также часть Up MGI адаптера (“PCR Oligos” на рис.1).

На завершительных стадиях протокола синтезированная кДНК амплифицируется с использованием специфических последовательностей олигонуклеотидов, которые с одного конца комплементарно гибридизуются в невариабельных доменах TCR генов (“C1”, “C2” на рис. 1), а с другого – в ранее упомянутой части Up MGI адаптера (“PCR Oligos” на Рис.1). На этой же стадии протокола вводятся технические последовательности олигонуклеотидов – адаптеры, для секвенирования образцов на платформе MGISEQ-2000 (“Up MGI адаптер”, “Bottom MGI адаптер” на рис.1) – при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляемой Encyclo ДНК-полимеразой (“Евроген”).

Альтернативный вариант панели (рис. 2), основан на введении MGI адаптеров при помощи ферментативного лигирования после 2-го раунда ПЦР.

Таким образом, разработанная по результатам данной работы панель позволяет получать данные секвенирования репертуаров Т-клеточных рецепторов для их последующего анализа: профилирования пациентов с БК с целью поиска последовательностей CDR3 региона, ассоциированных с исследуемым заболеванием.

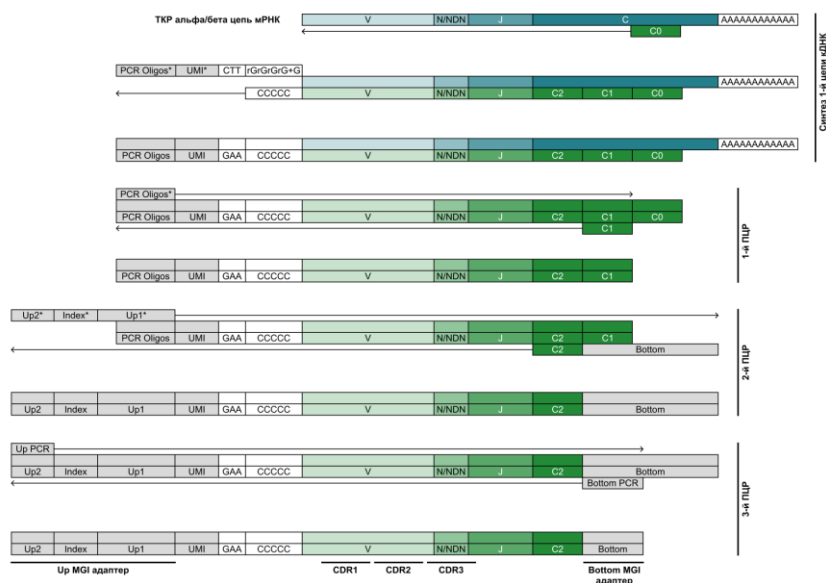


Рисунок. 1. Схема панели для целевого обогащения кДНК последовательностями Т-клеточных рецепторов для технологии секвенирования MGISEQ, методика ввода адаптеров на основе ПЦР

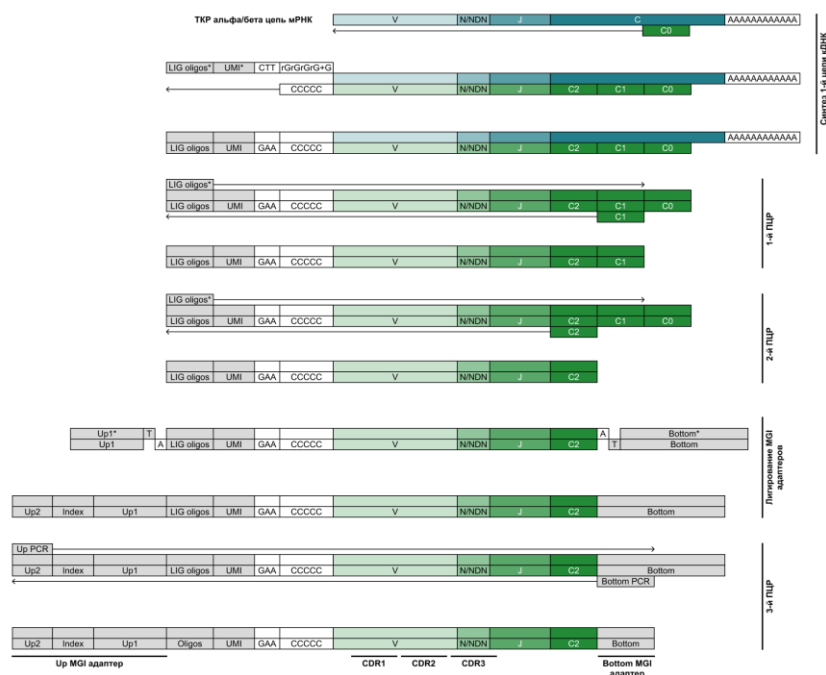


Рисунок. 2. Схема панели для целевого обогащения кДНК последовательностями Т-клеточных рецепторов для технологии секвенирования MGISEQ, методика ввода адаптеров на основе ферментативного лигирования

Литература

1. Rosati E., Rios Martini G., Pogorelyy M.V., et al. A novel unconventional T cell population enriched in Crohn's disease. *Gut*, (2022). 71, 2194-2204.
2. Mamedov I.Z., Britanova, O.V., Zvyagin I.V., Turchaninova M.A., Bolotin D.A., Putintseva E.V., Lebedev Y.B., Chudakov D.M. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Frontiers in immunology*, (2013). 4, 456.

УДК 577.2

Chi-сайт содержащие плазмиды активируют аллелиацию рестрикции EcoKI системы защиты

Д.Д. Яновская^{1,2}, М.А. Скутель², А.Б. Исаев²

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

² Сколковский институт науки и технологии

Мобильные элементы, такие как бактериофаги, плазмиды или транспозоны вносят огромный вклад в горизонтальный перенос генов у прокариота и имеют клиническое значение, поскольку могут переносить гены антибиотико-резистентности [1]. Однако, бактериальные системы рестрикции-модификации (Р-М) препятствуют проникновению чужеродной ДНК в клетку. Анти-рестрикторные стратегии в свою очередь способствуют распространению генов антибиотико-резистентности [2].

Р-М ферментативные комплексы типа I состоят из двух субъединиц эндонуклеазы рестрикции (HsdR), необходимых для транслокации и расщепления ДНК, одной субъединицы узнавания сайтов (HsdS) и двух субъединиц метилтрансферазы (HsdM). В зависимости от статуса метилирования ДНК этот комплекс может функционировать либо как рестриктаза, либо как метилаза. Неметилированная ДНК является мишенью для рестрикции, полуметилированные молекулы являются мишенью для дальнейшего метилирования, а полностью метилированная ДНК невосприимчива к рестрикции [3]. В редких случаях, неметилированная ДНК может возникать в бактериальной клетке в ходе процессов репликации и рекомбинации. Чтобы избежать аутоиммунного ответа, т.е. атаки Р-М I комплексов на собственный геном, эти системы подвержены дополнительной регуляции – феномен, известный как аллелиация рестрикции. Суть феномена заключается в протеолитической деградации HsdR субъединиц комплексов EcoKI с помощью ClpXP протеазы в ответ на гиперактивное поведение защитной системы.

Чтобы обойти действие Р-М I систем защиты многие фаги и конъюгативные плазмиды приобрели анти-рестрикционные белки, такие как Ocr, ArdA, ArdB, способные напрямую ингибировать Р-М комплексы [4]. Ранее также было показано, что некоторые неконъюгативные транспозоны кодируют предполагаемый ген *ardD*, ответственный за ингибирование Р-М I защиты [5]. Механизм действия *ardD* и факт наличия ArdD белка в клетке не был установлен, а сам ген был предсказан на антисмысловой цепи другого гена – *tniA*, хотя, кроме мутаций, нарушающих предполагаемый *ardD* locus, другие мутации в транспозоне также приводили к снижению анти-рестрикционной активности [6].

Для проверки роли продукта гена *ardD* в антирестрикции были получены конструкции транспозона Tn5053 со внесенным внутрь гена *ardD* stop-кодоном и с делецией гена *ardD*. Показано, что ген *ardD* не вносит свой вклад в ингибирование систем рестрикции-модификации I типа. В попытке определить механизм анти-рестрикции транспозона Tn5053 и схожих с ним транспозонов мы обратили внимание на то, что анти-рестрикция Tn5053 связана с феноменом ClpXP-зависимой аллелиации рестрикции [7]. Мы предположили, что именно появление неметирированных EcoKI сайтов в плазмиде запускает процесс расщепления HsdR субъединицы. Для проверки этой гипотезы мы удалили из Tn5053 EcoKI сайты, а также Chi-сайты, необходимые для RecBCD-зависимой рекомбинации. В каждом из случаев, это привело к полной потере анти-рестрикции. Дополнительно, мы показали, что делеция RecA также полностью снимает анти-рестрикцию, а делеции RecBCD снижают данную активность.

По итогам работы мы можем предложить модель, согласно которой активная рекомбинация в плаزمиде одновременно несущих Chi и EcoKI сайты приводит к появлению неметирированных EcoKI сайтов и запускает процесс аллелиации рестрикции, снижающий рестрикционную активность EcoKI систем. Именно этот механизм может объяснить анти-рестрикционные эффекты, ранее приписываемые *ardD* locusу неконъюгативных транспозонов.

Работа поддержана грантом РНФ (22-14-00004) а также грантом Министерства Науки и Образования Российской Федерации (075-10-2021-114).

Литература

1. Lee I.P.A., Eldakar O.T., Gogarten J.P., Andam C.P. Bacterial cooperation through horizontal gene transfer. Trends Ecol Evol. 2022 Mar;37(3):223-232. doi: 10.1016/j.tree.2021.11.006. PMID: 34815098.
2. Tock M.R., Dryden D.T. The biology of restriction and anti-restriction. Curr Opin Microbiol. 2005 Aug;8(4):466-72. doi: 10.1016/j.mib.2005.06.003. PMID: 15979932.
3. Loenen W.A.M., Dryden D.T.F., Raleigh E.A., Wilson G.G. Type I restriction enzymes and their relatives, Nucleic Acids Res., (2014) 42, 2044
4. Zavilgelsky G.B. Antirestriction. Mol Biol (Mosk). 2000 Sep-Oct;34(5):854-62. Russian. PMID: 11033812.
5. Zavilgelsky G.B., Kotova V.Y., Melkina O.E., Balabanov V.P., Mindlin S.Z. Proteolytic control of the antirestriction activity of Tn21, Tn5053, Tn5045 Tn501 TN402 non-conjugative transposons. Mol Biol (Mosk). 2015 Mar-Apr;49(2):334-41. Russian. PMID: 26065261.
6. Balabanov V.P., Kotova V.Y., Kholodii G.Y., Mindlin S.Z., Zavilgelsky G.B. A novel gene, ardD, determines antirestriction activity of the non-conjugative transposon Tn5053 and is located antisense within the tniA gene. FEMS Microbiol Lett. 2012 Dec;337(1):55-60. doi: 10.1111/1574-6968.12005. Epub 2012 Oct 3. PMID: 22967207; PMCID: PMC3533173.
7. Zavilgelskiĭ G.B., Kotova V.Iu., Mel'kina O.E., Pustovoit K.S. Antirestriction activity of the mercury resistance nonconjugative transposon Tn5053 is controlled by the protease ClpXP. Genetika. 2014 Sep;50(9):1033-9. Russian. PMID: 25735133.

УДК 577.22

Использование дрожжевой модели для изучения молекулярных процессов, происходящих при болезни Альцгеймера, методом сгуо СЛЕМ

Д.А. Мустафин^{1,2}, Ю.М. Чесноков^{1,3}, Т.Н. Голева², А.Г. Рогов²

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

³ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

Болезнь Альцгеймера – социально-значимое прогрессирующее возрастное нейродегенеративное заболевание коры головного мозга и гиппокампа, являющееся самой частой формой возрастной деменции и одной из основных причин смерти среди пожилого населения.

Маркерами болезни Альцгеймера являются появление внутриклеточных нейрофибриллярных тяжей и накопление амилоидных бляшек, состоящих из агрегатов белка А β -42.

В данный момент не существует лекарства от этой болезни, равно как и нет единой теории возникновения и протекания наиболее распространенной его формы – спорадической [1]. По-видимому, иницирующих факторов множество: старение, инсулин-независимый диабет, факторы окружающей среды и др. Некоторые исследования утверждают, что образование белковых бляшек вызывает окислительный стресс, а это приводит к дисфункции митохондрий [2,3] и всем последующим событиям. Комплексный характер заболевания усложняет понимание молекулярных процессов, происходящих в клетках при его патогенезе, что делает необходимым создание упрощенных моделей и прямых методов исследования.

Корреляционная свето-электронная микроскопия (CLEM) – комплексный метод визуализации биологических объектов, основанный на сочетании флуоресцентной и электронной микроскопии, дающей информацию об ультраструктуре объекта [4]. При этом, для достижения состояния, наиболее приближенного к нативному, лучше всего подходит микроскопия при низких температурах (cryo CLEM), а в качестве флуоресцентных маркером – экспрессируемые *in situ* конструкции, содержащие гены флуоресцентного белка [5].

Для исследования внутриклеточных консервативных процессов хорошо подходят дрожжевые модели, благодаря своей относительной простоте. Традиционные пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* плохо подходят для изучения митохондрий, поэтому в работе использованы дрожжи аэробного типа обмена *Yarrowia lipolytica*, имеющие полноценную дыхательную цепь “животного типа”, разветвленный митохондриальный ретикулум [1] и с точки зрения биоэнергетики гораздо лучше моделируют метаболизм нейронов, чем *S. cerevisiae*.

Методом клонирования Golden Gate были получены мутанты *Y. lipolytica*, экспрессирующие генетическую конструкцию для CLEM в виде зеленого флуоресцентного белка eGFP, слитого с белком А β -42.

Показано, что экспрессия конструкции eGFP-А β -42 приводила к появлению флуоресцирующих внутриклеточных агрегатов, появляющихся преимущественно на периферии клетки. После окраски дрожжей митохондриально-направленным красителем была показана частичная колокализация между митохондриями и агрегатами eGFP-А β -42 в клетках дрожжевой модели, что может свидетельствовать о контакте агрегатов с митохондриями, поэтому методом корреляционной криогенной микроскопии были исследованы предположительные места контакта митохондрий и белковых агрегатов (рис. 1, 2).

Работа выполнена при поддержке НИЦ Курчатовский институт (тематический план 1ф.4.1 «Изучение процессов генерации, передачи и распределения энергии в живых организмах, направленное на поиск новых подходов к созданию терапевтических средств, новых биоэнергетических устройств и систем искусственного фотосинтеза»).

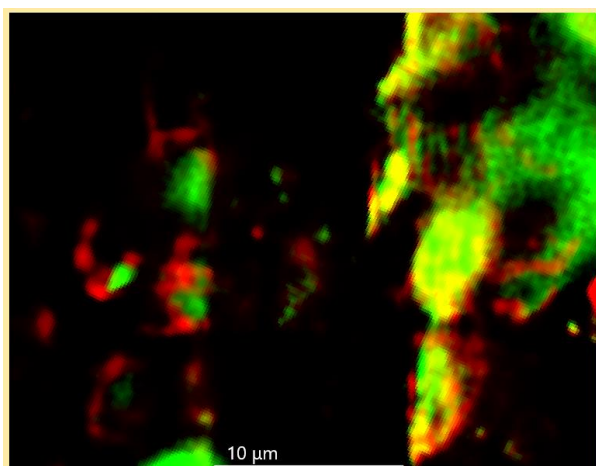


Рисунок 1. cryo CLEM-снимок ламели среза дрожжевых клеток. Красный – MitoTracker Red (митохондриально-направленный зонд), зеленый – белковые агрегаты eGFP-A β -42.

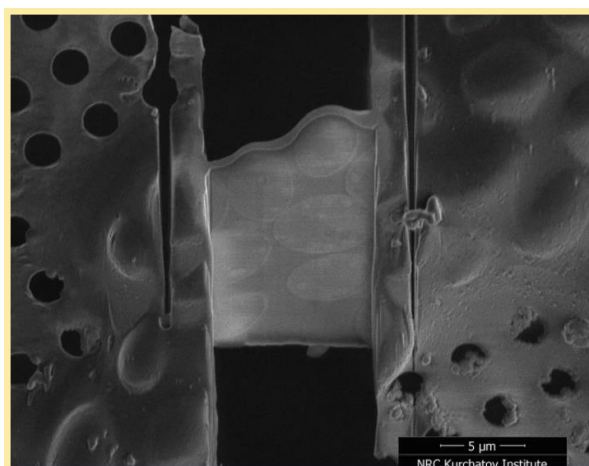


Рисунок 2. Изображение ламели на сканирующем электронном микроскопе.

Литература

1. Goleva T., Rogov A., Zvyagilskaya R. Alzheimer's Disease: Molecular Hallmarks and Yeast Models. // J Alzheimers Disease & Parkinsonism. 2017. V. 7. P. 394.
2. Chen Z., Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease // Neurosci Bull. 2014. V. 30 P. 271.
3. Kozlov S., Afonin A., Evsyukov I., Bondarenko A. Alzheimer's disease: as it was in the beginning // Rev Neurosci. 2017. V. 28 P. 825.
4. Dahlberg P.D., Saurabh S., Sartor A.M., Wang J., Mitchell P.G., Chiu W., Shapiro L., Moerner W.E. Cryogenic single-molecule fluorescence annotations for electron tomography reveal in situ organization of key proteins in Caulobacter // Proc Natl Acad Sci U S A. 2020. V. 117. P. 13937.
5. Clarke N.I., Royle S.J. FerriTag is a new genetically-encoded inducible tag for correlative light-electron microscopy // Nat Commun. 2018. V. 9. P. 2604.

УДК 577.21

Создание системы для выделения рецептора ACE2 человека с целью исследования механизма слияния вируса с мембраной клетки и разработки детектора вируса COVID-

19

Н.А. Есенкова, В.Н. Молодцов
ФБУН НИИ СБМ Роспотребнадзора

Случаи заболевания коронавирусной болезнью 2019 года, вызванные коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), продолжают фиксироваться. В связи с этим

необходимы новые быстрые и точные методы диагностики вируса. В предыдущих работах было показано, что вирус SARS-CoV-2 использует для входа в клетку белок-рецептор ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) [1].

Целью данной работы является создание системы, позволяющей получать ACE2 и его мутантные формы в количествах, достаточных для исследований по а) разработке прибора для детекции частиц вируса, используя связывания человеческого рецептора ACE2, посаженного на мембрану, с S-белком вируса и б) изучению механизма вирусной инфекции путем слияния вирусной частицы с мембраной клетки при активном участии рецептора ACE2.

Было проведено компьютерное моделирование для анализа оптимального расположения гистидинового тэга для аффинной очистки ACE2, а также определения размера сегмента трансмембранного домена, который позволял бы рецептору встраиваться в липидный бислой, сохраняя при этом растворимость ACE2 в цитоплазме *E. coli*.

Ген рекомбинантного ACE2, кодон-оптимизированный для экспрессии в *E. coli* был синтезирован. Экспрессионный вектор был создан на основе коммерческой плазмиды pET21a. Плазида была трансформирована в экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3), а индукция экспрессии ACE2 проводилась добавлением IPTG. Выделение ACE2 из индуцированных клеток при помощи аффинной хроматографии Ni-NTA выявило отсутствие этого белка в растворимой фракции. Полученные результаты указывали на токсичность экспрессируемого варианта ACE2 для бактериальных клеток.

Была предпринята попытка создания укороченного варианта ACE2, основанная на данных компьютерного моделирования. Данный вариант ACE2 содержит только часть сайта связывания S-белка, состоящий из 2 α -спиралей, а также фрагмент трансмембранного домена для закрепления на мембране. Последовательность гена укороченного варианта ACE2 была смоделирована и собрана *de novo* ПЦР-амплификацией из синтетических олигонуклеотидов. После экспрессии короткого белка в *E. coli* BL21(DE3) было обнаружено, что белок содержится в тельцах включения. Далее предполагается исследовать возможность повышения растворимости ACE2.

Параллельно ведется работа по созданию системы экспрессии вариантов ACE2 в эмбриональных клетках почки человека (HEK 293). Завершён дизайн экспрессионного вектора, который содержит ген ACE2, кодирующий дополнительный сигнальный пептид MMRPLLLLLLSALA для экспорта синтезированного белка в культуральную среду[2]. Основой для разработки данного экспрессионного вектора был выбран коммерческий вариант плазмиды pLVT. После подтверждения успешной экспрессии ACE2 в данной системе, рецептор планируется выделять из культуральной среды методами аффинной и ионно-обменной хроматографии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-15-00265.

Литература

1. Zhang Y., Yan R., Zhou Q. ACE2, B0AT1, and SARS-CoV-2 spike protein: Structural and functional implications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2022**, 74, 102388.
2. Arias-Arias J.L., Molina-Castro S.E., Monturiol-Gross L., Lomonte B., Corrales-Aguilar E. Stable production of recombinant SARS-CoV-2 receptor-binding domain in mammalian cells with co-expression of a fluorescent reporter and its validation as antigenic target for COVID-19 serology testing. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2023 Mar;37:e00780. doi: 10.1016/j.btre.2022.e00780. Epub 2022 Dec 31.

УДК 579.2

Исследование виroma человека при помощи данных метагеномного секвенирования

Н.С. Попов, А.И. Манолов, И.В. Сонец, Л.Н. Пенкин, Е.Н. Ильина

Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора

Выявление и определение вирусов, циркулирующих в человеческой популяции, имеет большое значение для здоровья человека, особенно в условиях возникающих вспышек инфекционных заболеваний и при установлении причин болезней неизвестной этиологии. Важно отметить, что РНК-вирусы наиболее интересны с точки зрения вероятности возникновения новых зоонозных инфекций [1].

Целью настоящего исследования является характеристика вирусов, встречающихся в образцах, полученных от людей. Планируется выявление изменений в популяции вирусов, циркулирующих в человеческой популяции. В проекте исследуются как образцы, полученные нами, так и внешние данные.

Были разработаны подходы и вычислительные конвейеры для поиска вирусных последовательностей в данных метагеномного секвенирования кДНК.

Были предложены три подхода, два из которых основываются на базе полногеномных последовательностей вирусов, а третий основывается на базе последовательностей консервативного фрагмента РНК полимеразы. Все три подхода включают в себя шаги сборки прочтений *de-novo* и фильтрации нецелевых последовательностей.

Первый подход основан на использовании распространенных утилит для таксономической аннотации (Kraken2, CAT/BAT) [2, 3]. Этот подход имеет наибольшую чувствительность, но ограничивает спектр возможных находок последовательностями, которые представлены в используемой базе.

Второй подход основан на сборке *de-novo* фрагментов геномной последовательности и сравнении с базой полных геномных последовательностей различных вирусов эукариот. Он обладает меньшей чувствительностью (для сборки фрагментов достаточной длины требуются от десятков до сотен прочтений), но и большей специфичностью (большая длина сравниваемых фрагментов уменьшает неоднозначность классификации). Этот подход потенциально способен выявлять представителей большого числа малоизученных вирусов, для которых еще не были получены полные расшифровки геномной последовательности.

Третий подход основан на поиске консервативного фрагмента РНК-полимеразы и также включает в себя этап сборки прочтений *de-novo*. Он обладает наименьшей чувствительностью, поскольку для успешного обнаружения вирусной последовательности требуется сборка фрагмента, включающего искомый фрагмент гена РНК-полимеразы, но данный подход позволяет находить последовательности от вирусов, для которых нет полногеномной последовательности, но имеется база консервативных фрагментов РНК-полимераз содержит множество последовательностей от подобных таксонов, обнаруженных в ходе метагеномных исследований.

Все три подхода были применены к ряду объектов исследования: 1) к назофарингеальным мазкам амбулаторных пациентов, являющихся носителями вируса SARS-CoV-2, 2) к образцам кала пожилых людей.

На данный момент производится анализ данных базы SRA, полученных у людей на территории России.

В мазках амбулаторных пациентов с новой коронавирусной инфекцией с помощью первых двух методов был выявлены последовательности вируса SARS-CoV-2, ряда вирусов растений и простейших, вирус простого герпеса первого типа и вирус мышинного гриппа (Sendai virus). Стоит отметить, что вирус мышинного гриппа является характерным для грызунов, считается не патогенным для человека, но может реплицироваться в обезьянах [4]. Кроме того, наряду с коронавирусами он был найден у панголинов [5]. С помощью третьего метода удалось выявить присутствие в образцах коронавируса SARS-CoV2, вирус огуречной мозаики и вирус простейшего *Trichomonas vaginalis*. Также было обнаружено присутствие неклассифицируемых вирусов семейства Picobirnaviridae.

В образцах кала пожилых людей были при помощи утилиты Kraken2 были обнаружены вирусы растений и прокариот.

Работа выполнена на базе НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора в рамках госзадания “Разработка алгоритмов для выявления новых, уникальных последовательностей ДНК или РНК в метагеномах и их фенотипическая характеристика *in vitro*”, номер 12203090069-4.

Литература

1. Gray G.C., Abdelgadir A. While We Endure This Pandemic, What New Respiratory Virus Threats Are We Missing? // Open Forum Infectious Diseases. 2021. № 3 (8). С. ofab078.

2. Wood D.E., Lu J. Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol* 20, 257 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
3. von Meijenfildt F.A.B., Arkhipova K., Cambuy D.D. et al. Robust taxonomic classification of uncharted microbial sequences and bins with CAT and BAT. *Genome Biol* 20, 217 (2019).
4. Skiadopoulos M H. et al. Sendai Virus, a Murine Parainfluenza Virus Type 1, Replicates to a Level Similar to Human PIV1 in the Upper and Lower Respiratory Tract of African Green Monkeys and Chimpanzees // *Virology*. 2002. № 1 (297). С. 153–160.
5. Edgar R.C. et al. Petabase-scale sequence alignment catalyses viral discovery // *Nature*. 2022. № 7895 (602). С. 142–147.

УДК 616-006.04

Критерии подлинности химерных транскриптов, обнаруженных в ходе анализа данных РНК-секвенирования злокачественных опухолей

Е.Н. Рабушко¹, М.И. Сорокин^{1,2}, М.В. Сунцова^{1,2}, А.А. Буздин^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова

Химерные гены образуются в результате слияния частей различных генов и являются характерной чертой генома раковых клеток [1]. Особый интерес представляют химерные гены рецепторных тирозинкиназ (РТК) вследствие их значимости для прогнозирования заболевания и выбора терапии [2]. Для поиска одновременно новых и уже описанных химерных транскриптов применяют методы, основанные на анализе данных РНК-секвенирования. Однако разработанные алгоритмы наряду с истинными находят еще большее число артефактных слияний [3]. Поэтому для верификации результатов используют дополнительную экспериментальную проверку, что увеличивает требуемые для анализа время и количество биоматериала – критически важные параметры для успешной диагностики. Валидация особенно важна при анализе данных РНК-секвенирования фиксированных в формалине парафинизированных (FFPE) образцов, распространенного в клинической практике типа биоматериала, из-за повышенной степени деградации РНК и образования артефактных слияний в ходе пробоподготовки [4]. Выявление критериев для аналитической верификации химерных транскриптов, обнаруженных в ходе анализа данных РНК-секвенирования различных типов биоматериалов, повысит качество детекции химерных генов, а следовательно, увеличит эффективность лечения ряда случаев онкозаболеваний.

В представленной работе проанализированы профили РНК-секвенирования 862 экспериментальных образцов и найдены 36 потенциальных химерных транскриптов генов РТК. Проведена экспериментальная валидация методом ОТ-ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру потенциальных химерных транскриптов в образцах, биоматериалы которых были доступны. Мы установили характерные черты для подтвержденных экспериментально химерных транскриптов: сохранение открытой рамки считывания и тирозинкиназного домена, значимый дисбаланс покрытия экзонов РТК до/после точки химеризации, для большинства подтвержденных химерных транскриптов найдено больше одного химерного прочтения в данных РНК-секвенирования (табл. 1).

Стоит отметить, что ни один из экспериментально неподтвержденных химерных транскриптов не отвечает одновременно минимум трем критериям. Таким образом, наложение ограничения соблюдения минимум трех из пяти предложенных критериев позволяет достичь 90% чувствительности и 100% специфичности. Полученные результаты могут служить основой для создания алгоритма для автоматической аннотации химерных транскриптов РТК по данным РНК-секвенирования.

Работа поддержана грантом РФФ 20-75-10071 от 20 июля 2020 года.

Таблица 1. Сравнение характеристик, подтвержденных и неподтвержденных химерных транскриптов

Критерий	Сохранение открытой рамки считывания	Сохранение экзонов, кодирующих тирозинкиназный домен	Наличие в базах данных	Число химерных прочтений больше 1	Значимая разница покрытия экзонов РТК до/после точки химеризации
----------	--------------------------------------	------------------------------------------------------	------------------------	-----------------------------------	------------------------------------------------------------------

Число подтвержденных	10	8 из 10	7 из 10	7 из 10	7 из 9
Число не-подтвержденных	15	5 из 15	2 из 15	0 из 15	0 из 15
Чувствительность	0,8	0,9	0,7	0,7	0,78
Специфичность	0,67	0,87	1	1	1

Литература

1. *Yoshihara K., Wang Q., Torres-Garcia W., Zheng S., Vegesna R., Kim H., et al.* The landscape and therapeutic relevance of cancer-associated transcript fusions. *Oncogene*. 2015 Sep 10;34(37):4845–54.
2. *Stransky N., Cerami E., Schalm .S, Kim J.L., Lengauer C.* The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun*. 2014 Sep 10;5:4846.
3. *Haas B.J., Dobin A., Li B., Stransky N., Pochet N., Regev A.* Accuracy assessment of fusion transcript detection via read-mapping and de novo fusion transcript assembly-based methods. *Genome Biol*. 2019 Oct 21;20(1):213.
4. *Arreaza G., Qiu P., Pang L., Albright A., Hong L.Z., Marton M.J. et al.* Pre-Analytical Considerations for Successful Next-Generation Sequencing (NGS): Challenges and Opportunities for Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Tissue (FFPE) Samples. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 20;17(9).

УДК 616-074/079.4

Анализ желчных кислот и их конъюгатов в биологических образцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

А.В. Комарова^{1,2}, Я.Д. Шанский¹, А.В. Господарик¹, Г.З. Серёгин³, С.С. Есиев¹, Г.О. Бронин³, Ю.А. Беспятовых^{1,2}

¹ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Центр молекулярной медицины и диагностики

²ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

³ГБУЗ города Москвы «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы», Отделение трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток

Желчные кислоты (ЖК) представляют собой группу органических соединений, играющих важную роль в регуляции обмена липидов и глюкозы и синтезируемых *in vivo* в печени и в кишечнике при участии кишечной микробиоты [1]. Нарушения последней ассоциированы с вирусными и бактериальными инфекциями, а также с антибиотикотерапией, которая может сопровождаться наиболее тяжелой формой кишечного дисбиоза – инфекцией *Clostridioides difficile* [3]. К настоящему времени показана эффективность лечения клостридиальной инфекции путем трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ) [2,3]. В то же время эффективность ТФМ при вирусных инфекциях изучена недостаточно. По качественному и количественному содержанию ЖК в кале можно судить о характере и глубине протекания дисбиотических нарушений, а также об эффективности проводимой ТФМ. В этой связи актуальным является разработка надежной и универсальной методики для количественного анализа большого диапазона концентраций желчных кислот [4–6]. Анализ желчных кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) обеспечивает наиболее высокую чувствительность и специфичность для обнаружения и идентификации желчных кислот. Целью исследования стала разработка и адаптация методики определения содержания желчных кислот и их конъюгатов в организме пациентов с назначенной ТФМ методом ВЭЖХ-МС/МС.

Исследование проведено на образцах кала, полученных от пациента с антибиотикоассоциированной диареей, обусловленной сочетанием клостридиальной и астровирусной инфекции на фоне многокомпонентной противомикробной терапии. Исследование проводили до и после ТФМ.

Выделение ЖК проводили методом сухого пятна после экстракции с помощью раствора натрия гидроксида (0.05 М). Разделение осуществляли с помощью хроматографа Accela (ThermoFisher Scientific, США) на колонке Hypersil ODS C18 (ThermoFisher Scientific, США). Подвижная фаза – градиентная

смесь раствора аммония ацетата (10 мМ) и ацетонитрила. Детекцию проводили на трехквартупольном масс-спектрометре LXQ (ThermoFisher Scientific, США). Количественный анализ осуществляли методом внутреннего стандарта. Калибровочный график строили по результатам анализа стандартных растворов желчных кислот с концентрацией 0.009, 0.087, 0.87, 8.7, 44.3 и 77 мкг/мл. В ходе работы подобраны оптимальные условия масс-спектрометрического анализа: ионизация электрораспылением в режиме детекции отрицательных ионов, вольтаж иглы – 4500 В, потенциал ионизации 25–30 В, температура 380°C, давление распыляющего газа 40 psi, время сканирования 50 мс.

Перед ТФМ у пациента наблюдали некупируемую диарею (стул до 10 раз в сутки); присутствие кластридиального токсина А, энтероинвазивной *Escherichia coli* и РНК астровируса в стуле. Дисфункция микробиоты кишечника приводит к снижению трансформации первичных конъюгированных ЖК во вторичные, что, вероятно, может объяснять чрезвычайно малое (ниже предела обнаружения методики) содержание индивидуальных ЖК у реципиента [7]. После двух сеансов ТФМ отмечали улучшение общего состояния пациента, нормализацию стула, отсутствие токсина А *C. difficile*, ДНК энтероинвазивной *E. coli* и РНК астровируса в кале. После терапии отмечался рост показателей холевой кислоты (табл. 1) и, в особенности, дезоксихолевой кислоты (ДСА), а также повышение концентраций таурин- и глицин-конъюгированных ЖК. ДСА является мощным антимикробным агентом, способным уменьшать воспалительные процессы при нарушениях функционала микробиоты [8]. Повышенный уровень ДСА у реципиента после ТФМ указывает на улучшение функционирования микробиоты кишечника [7]. Наличие конъюгированных ЖК в кале может говорить о сниженной активности/небольшом количестве бактерий *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, регулирующих деконъюгацию ЖК [9]. Уровень ЖК в биоматериале донора и реципиента (табл. 1) значительно различается в содержании соединений, что может свидетельствовать о незавершенном (на момент наблюдения) заселении кишечника реципиента донорской микробиотой.

В заключение можно сделать вывод о том, что улучшение профиля уровней ЖК дает основание судить об эффективности ТФМ и улучшении состояния и функционирования микробиоты кишечника.

Таблица 1. Сравнение содержания ЖК в кале реципиента до и после процедуры ТФМ (мкг/г материала)

ЖК	Реципиент (до ТФМ)	Реципиент (после ТФМ)
Таурохолевая кислота	-	0.110
Гликоурсодезоксихолевая кислота	0.001	0.270
Таурохенодезоксихолевая кислота	-	-
Гликохолевая кислота	-	-
Тауроурсодезоксихолевая кислота	-	0.150
Гликохенодезоксихолевая кислота	0.003	-
Холевая кислота	-	0.270
Хенодезоксихолевая кислота	-	-
Тауродезоксихолевая кислота	-	-
Дезоксихолевая кислота	0.001	1.560
Урсодезоксихолевая кислота	-	-
Литохолевая кислота	-	-
Тауролитохолевая кислота	-	-

Литература

1. Park J.W. et al. Role of Microbiota-Derived Metabolites in Alcoholic and Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases // International Journal of Molecular Sciences, 2022. Vol. 23. P. 426.
2. Голощапов О.В. и др. Трансплантация фекальной микробиоты при реакции "трансплантат против хозяина" у детей и взрослых: методы, клинические эффекты, безопасность // Терапевтический архив, 2020. Т. 92. №. 7. С. 43-54.
3. Dong N., Li Z.R., Qin P., et al. Risk factors for Clostridioides difficile infection in children: a systematic review and meta-analysis. The Journal of hospital infection 2022(130): 112-121. doi:10.1016/j.jhin.2022.09.004
4. Humbert L. et al. Bile acid profiling in human biological samples: comparison of extraction procedures and application to normal and cholestatic patients // Journal of Chromatography B, 2012. Vol. 899. P. 135-145.

5. Shi N., Li N., Duan X., Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system // *Mil. Med. Res.*, 2017. Vol. 4. P. 14.
6. Kakiyama G. et al. A simple and accurate HPLC method for fecal bile acid profile in healthy and cirrhotic subjects: validation by GC-MS and LC-MS [S] // *Journal of lipid research*, 2014. Vol. 55. P. 978-990.
7. Kamp K.J. et al. Bile acids and microbiome among individuals with irritable bowel syndrome and healthy volunteers // *Biological research for nursing*, 2021. Vol. 23. P. 65-74.
8. Perino A. et al. Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging // *Physiological reviews*, 2021. Vol. 101. P. 683-731.
9. Foley M.H. et al. Bile salt hydrolases: Gatekeepers of bile acid metabolism and host-microbiome crosstalk in the gastrointestinal tract // *PLoS pathogens*, 2019. Vol. 15. P. e1007581.

УДК 614.47

Разработка методики модификации флуоресцентных микросфер при создании диагностической тест-системы для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу SARS-CoV-2

Л.В. Плотникова¹, Р.И. Шакуров², Я.Д. Шанский², К.А. Прусаков², С.В. Сизова³, Д.В. Басманов², Ю.А. Беспятых^{1,2}

¹Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева

Факультет химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов

²ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им.

академика Ю.М. Лопухина ФМБА России

³ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

В настоящее время активно развиваются альтернативные методы диагностики, в том числе с использованием микрофлюидных технологий. При подготовке специфичной и чувствительной тест-системы требуется использование методов предварительной обработки микросфер с применением различных химических реагентов. Для успешной детекции иммуноглобулинов класса G (IgG) к SARS-CoV-2 в сыворотке крови человека необходимо минимизировать неспецифическое связывание с активированной поверхностью микросфер [1, 2]. Для этого нужно подобрать оптимальный блокировочный агент, который не будет мешать детекции антител, а также не снизит чувствительность и специфичность диагностической тест-системы.

В работе использовали парамагнитные полилактидные микросферы «Magplex-C 056» диаметром 6.5 ± 0.2 мкм с поверхностными карбоксильными группами, с паспортными флуоресцентными метками Alexa Fluor 635 и Alexa Fluor 700 (Luminex, США). Первым этапом в работе была активация поверхности микросфер с получением активных амидных групп при помощи карбодимидной реакции. После отмывки добавляли образец, содержащий антиген (белок RBD-домена SARS-CoV-2), ковалентно связывающийся с поверхностью микросфер. Далее для предотвращения неспецифического связывания добавляли блокировочный агент. В качестве блокировочных агентов нами были выбраны следующие варианты: 5% раствор этаноламина (SigmaAldrich, США) в фосфатно-солевом буфере (Biorad, США); раствор альгината натрия (SigmaAldrich, США) в фосфатно-солевом буфере с концентрацией альгината 1 мг/мл; 5% раствор казеина в фосфатно-солевом буфере (Biorad, США); 5% раствор глюкозы (SigmaAldrich, США) в фосфатно-солевом буфере; 5%/5% раствор глюкозы и казеина в фосфатно-солевом буфере; 5% раствор аргинина (Abcam, США) в фосфатно-солевом буфере; раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА, SigmaAldrich, США) в фосфатно-солевом буфере с концентрацией БСА 0,1 мг/мл.

После этого добавляли стандарт антител, содержащий IgG. Для детекции антител, связавшихся с антигенами на поверхности микросфер, были использованы вторичные козы антитела (Invitrogen, США) против иммуноглобулинов человека, меченые флуорофором (фикоэритрин). Интенсивность флуоресценции образующегося иммунного комплекса измеряли на аппаратном комплексе «Монумент» с программным обеспечением “Bead Recognizer”.

Согласно полученным данным наиболее подходящими блокировочными агентами в области концентраций IgG 0–100 ВАУ/мл являются аргинин (рис. 1) и бычий сывороточный альбумин (рис.

2). При использовании указанных блокировочных агентов наблюдалась выраженная линейная зависимость между концентрацией IgG и интенсивностью флуоресценции.

С другими вариантами блокировочных агентов (альгинат, казеин) линейной зависимости не наблюдалось, что свидетельствует о том, что данные способы блокировки неспецифического связывания не подходят для применения в нашей работе.

По результатам работы можно сделать вывод, что для модификации полилактидных микросфер с поверхностными карбоксильными группами в целях детектирования IgG к SARS-CoV-2 в сыворотке крови человека наиболее оптимальным методом блокировки неспецифического связывания антител является применение 5% раствора аргинина или раствора БСА (0,1 мг/мл). Их использование обеспечивает сохранение линейной зависимости флуоресцентного сигнала иммунного комплекса от концентрации IgG в сыворотке крови человека.

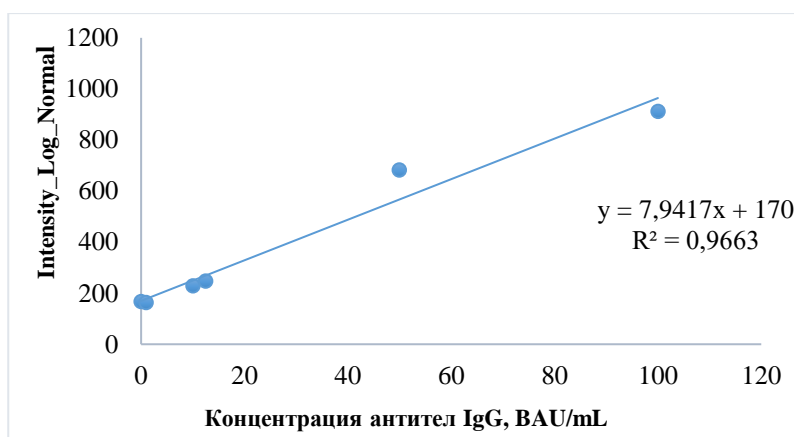


Рисунок 1. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации IgG при использовании аргинина для блокировки неспецифического связывания

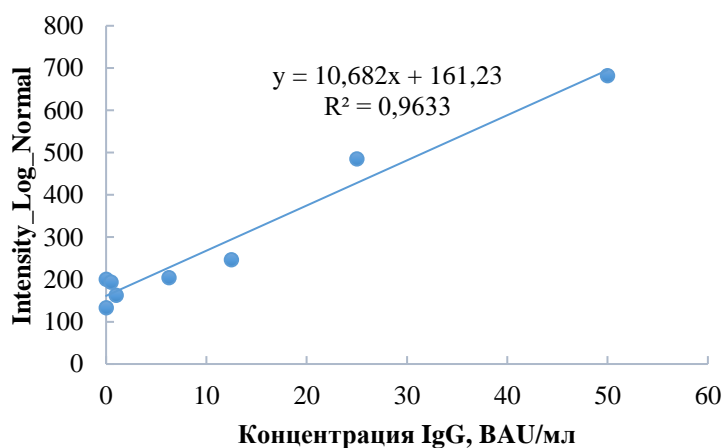


Рисунок 2. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации IgG при использовании бычьего сывороточного альбумина для блокировки неспецифического связывания

Литература

1. *Sentandreu M., Aubry L., Toldrà F., Ouali A.* Blocking agents for ELISA quantification of compounds coming from bovine muscle crude extracts. *European Food Research and Technology.* (2007). 224. 623-628. 10.1007/s00217-006-0348-3.

2. *Lakshmi priya Th., Fujimaki M., Awazu K., Horiguchi Y., Nagasaki Y.* A high-performance waveguide-mode biosensor for detection of factor IX using PEG-based blocking agents to suppress non-specific binding and improve sensitivity. *The Analyst.* (2013). 138. 10.1039/c3an00298e.

Исследование возможности использования аденоассоциированного вируса в качестве вектора для вакцины от коронавирусной инфекции 2019 года

А.А. Коган, С.Г. Феоктистова

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

В настоящее время решение проблемы вакцинации населения от COVID-19 является одной из ключевых задач медицинского и биологического сообщества. Ранее разработанные комбинированные векторные вакцины в значительной мере способствуют профилактике новой коронавирусной инфекции [1], однако имеют ключевой недостаток в наличии у большей части населения ранее приобретенного иммунитета ко входящим в их состав аденовирусным векторам [2, 3] и угрозе выработки иммунного ответа на ранее инъецированные серотипы, что обязывает к поиску иных вариантов иммунизации.

Одним из хорошо изученных и безопасных вирусных векторов является вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) – малого ДНК-вируса из семейства парвовирусов, не кодирующего собственные ферменты репликации и не вызывающего заболеваний у человека [4]. В данной работе рассматривалась возможность применения данного вирусного вектора в разработке вакцины от COVID-19.

На первом этапе были выбраны наиболее оптимальные серотипы AAV. Для решения данной задачи в левое бедро лабораторных мышей была проведена инъекция препарата, содержащего AAV-частицы серотипов 1, 2 и 9 (AAV1, AAV2, AAV9) с индуцированным дефицитом репликации и геном GFP в качестве трансгена в концентрации $5 \cdot 10^{10}$ вч/мышь. Через 14 дней после введения была произведена оценка уровня экспрессии GFP методом прижизненной *in vivo* визуализации, а также оценка количества мРНК GFP в тканях печени и бедренных мышц. Результаты показали явную локализацию препарата и высокую эффективность экспрессии GFP в левом бедре у мышей, инъецированных AAV9-GFP, хорошую локализацию, но более низкую эффективность экспрессии GFP – для AAV1-GFP. Аналогичные показатели мышей, инъецированных AAV2-GFP были низки. Во всех трех случаях эффективность экспрессии GFP в тканях печени была значительно ниже, чем в мышцах бедра.

На следующем этапе была получена экспрессионная кассета, включающая в себя промотор вируса SV40, ген спайк-белка вируса SARS-CoV-2 дикого типа и синтетический сигнал полиаденилирования. Данная кассета показала высокую эффективность экспрессии спайк-белка при трансдукции клеточной культуры HEK293T вирусными частицами AAV2-S и была выбрана для проведения *in vivo* эксперимента.

Суть эксперимента заключалась в гетерологической прайм-буст вакцинации (с промежутком между инъекциями в 14 дней) 3-х групп мышей C57BL/6 препаратом Гам-КОВИД-Вак, нерепликативными AAV1-, AAV2- и AAV9-частицами с геном спайк-белка вируса SARS-CoV-2 (AAV1-S, AAV2-S, AAV9-S). Первая группа была вакцинирована AAV1-S и AAV2-S как первым и вторым компонентами с промежутком между инъекциями в 14 дней; вторая группа – Гам-КОВИД-Вак (компонент 1) и AAV1-S/AAV9-S; третья группа – AAV1-S и AAV9-S с добавлением различных адъювантов (два CpG-олигонуклеотида, CFA) при каждом введении. После введения второго компонента во всех группах, кроме инъецированной CFA, наблюдался рост концентрации антител IgG в сыворотке крови, характерный для прайм-буст вакцинации.

Также был проведен *in vivo* эксперимент для выявления возможности использования нашей вакцины (AAV1-S, AAV9-S) в качестве однокомпонентного агента для ревакцинации после полной инъекции Гам-КОВИД-Вак.

Полученные данные по прайм-буст вакцинации мышей с помощью аденоассоциированных вирусных векторов в перспективе открывают возможности для подбора более иммуногенной последовательности трансгена и серотипа AAV, а также в целом более детального изучения AAV как потенциальной базы при разработке вакцин.

Литература

1. Jones I., Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. The Lancet. 2021 Feb 20;397(10275):642-3.
2. Barouch D.H., et al. Immunogenicity of recombinant adenovirus serotype 35 vaccine in the presence of pre-existing anti-Ad5 immunity. The Journal of Immunology. 2004 May 15;172(10):6290-7.

3. Barouch D.H., et al. Plasmid chemokines and colony-stimulating factors enhance the immunogenicity of DNA priming-viral vector boosting human immunodeficiency virus type 1 vaccines. Journal of virology. 2003 Aug 15;77(16):8729-35.

4. Berns K.I., et al. Biology of adeno-associated virus. Adeno-Associated Virus (AAV) vectors in gene therapy. 1996:1-23.

УДК 543.544.5.068.7

Определение содержания кофеина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в продуктах питания и сыворотке крови человека

Л.В. Кузьменко¹, Я.Д. Шанский², Ю.А. Беспятых^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

²ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Центр молекулярной медицины и диагностики

Алкалоиды пуринового ряда, содержащиеся в бобах кофейного дерева, листьях чая, мате, ягодах гуараны, а также в небольших количествах в бобах какао-дерева, оказывают тонизирующее действие на организм. К ним относятся: кофеин (1,3,7-триметилксантин), теофиллин (1,3-диметилксантин) и теобромин (3,7-диметилксантин). Данные соединения являются психоактивными веществами, в небольших количествах они стимулируют центральную нервную систему (ЦНС) человека, способствуют повышению умственной и физической работоспособности, усилению сердечной активности, повышают активность коры головного мозга: стимулируют моторную активность, сокращают время реакции, закрепляют условные рефлексы, однако чрезмерное потребление (например, регулярный прием более 450 мг кофеина в сутки или разовое употребление в тех количествах) приводит к эффекту ажитации либо угнетенности, бессоннице, головной боли, физической слабости, тремору и психической неустойчивости [2, 3].

В связи с этим, актуальным является проведение качественного и количественного анализа содержания данных веществ в пищевых продуктах (кофе, чай, энергетические, газированные напитки, шоколад), а также биологических жидкостях человека в первую очередь для информирования населения, так как вопрос о безопасности их потребления еще не решен. Для определения кофеина используют метод йодометрического титрования, фотоколориметрии, спектрофотометрии, а также высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Последняя, в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС), обеспечивает наибольшую чувствительность и специфичность при определении ксантинов [2, 4]

Целью данного исследования было провести количественное измерение содержания кофеина в пищевом продукте- гранулированном растворимом кофе, а также в сыворотке крови человека, употреблявшего кофе.

Объектом исследования был готовый кофейный продукт, полученный растворением 6 г кофе гранулированного растворимого (Nescafe) в 300 мл воды (ожидаемая конечная концентрация кофеина 180 мкг/мл), а также сыворотка крови добровольца, употребившего кофе, полученная спустя 3 часа. Пробоподготовка в обоих случаях проводилась путем жидкость-жидкостной экстракции. К 20 мкл раствора образца (для сыворотки крови и растворимого кофе пробоподготовка проводилась одинаково) добавляли 180 мкл воды I класса (LiChrosolv, Германия), затем разводили это 1000 мкл ацетонитрила (LiChrosolv, Германия) и оставляли на холод для преципитации белков в течение 20 мин, после чего центрифугировали и отбирали супернатант, который выпаривали при 60 °С. Осадок, полученный в результате выпаривания разводили ацетонитрилом (200 мкл) и переносили в вials.

Для серии стандартных растворов и анализируемых образцов методом ВЭЖХ-МС/МС было определено количественное содержание кофеина. Разделение осуществляли с помощью хроматографа Accela (ThermoFisher Scientific, США) на колонке Hypersil ODS C18 (ThermoFisher Scientific, США). Подвижная фаза – градиентная смесь раствора муравьиной кислоты (10 мМ) и ацетонитрила. Детекцию проводили на трехквadrupольном масс-спектрометре LXQ (ThermoFisher Scientific, США) в режиме обнаружения положительно заряженных ионов. Метод ионизации – электроспрейный. Газ-носитель в данной системе – гелий; оболочечный и защитный газ – азот. В качестве бланка используется метанол.

Количественный анализ осуществляли методом внешнего стандарта (концентрации стандартных растворов: 0,005, 0,05, 0,5, 5,0 и 10,0 мкг/мл).

В результате проведенного исследования было определено: отношение массы к заряду (m/z) составляет 137,97; время выхода пика кофеина – 3,13 мин; концентрация кофеина в кофе – 130,0 мкг/мл, в сыворотке крови – 0,99 мкг/мл. По полученным значениям концентрации в пищевом продукте можно сделать вывод о более низком содержании кофеина в сравнении с заявленным или его деградации в процессе хранения. Концентрация кофеина в сыворотке крови человека соответствует фармакокинетике вещества при пероральном введении (~1,0 мкг/мл) [5] в исследованном временном интервале (3 часа). Вид полученной хроматограммы (рис. 1) свидетельствует о том, что анализ обладает высокой селективностью, а также эффективностью разделения. Полученные данные подтверждают, что метод ВЭЖХ-МС/МС – один из наиболее предпочтительных для детектирования кофеина и его производных в продуктах питания и биологических жидкостях человека.

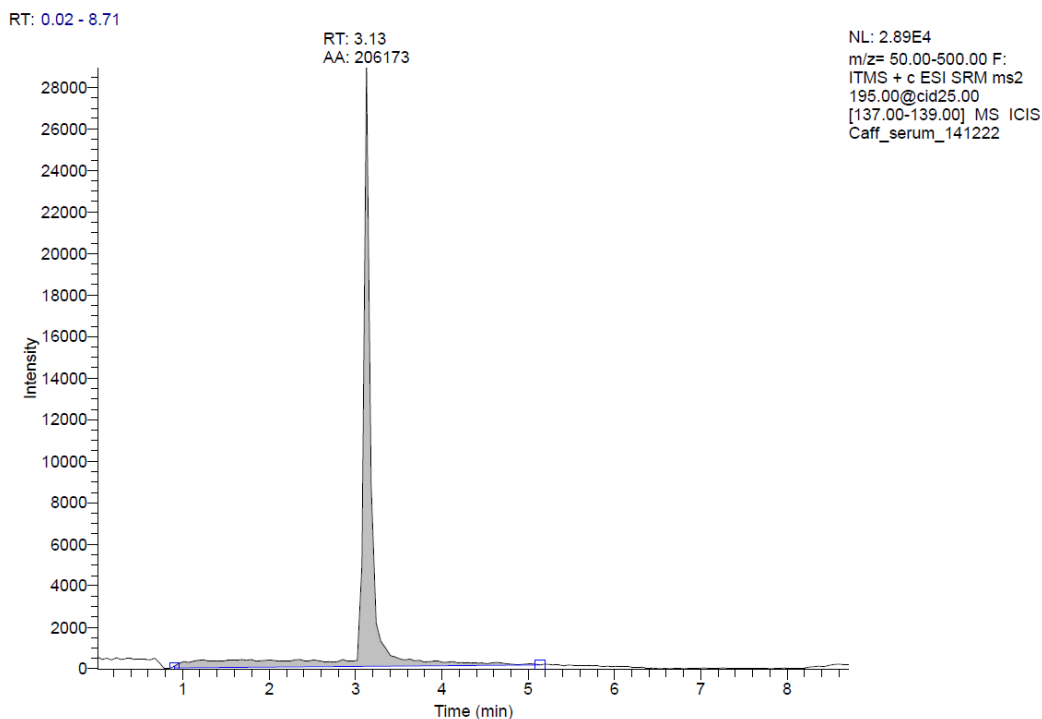


Рисунок 1. Хроматографический профиль кофеина в образце сыворотки крови человека

Литература

1. Лобанова Е.Н., Маслова Т.А., Смахтина М.В. Кофеин и его влияние на здоровье людей // *Молодежь и XXI век* – 2018. – Т. 4. – С. 53-57.
2. Mendes V.M., Coelho M., Tomé A.R., Cunha R.A., Manadas B. Validation of an LC-MS/MS Method for the Quantification of Caffeine and Theobromine Using Non-Matched Matrix Calibration Curve // *Molecules*, 2019.2 4, no. 16: 2863. <https://doi.org/10.3390/molecules24162863>
3. Зайнуллин Р.А., Кунакова Р.В., Егорова Е.Ю. Кофе, кофеин и генетика человека // *Пиво и напитки* – 2015. – №6. – С. 50-54.
4. Пилипенко В.П., Бирик О.В., Прихода Н.И. Сравнительная характеристика методов определения кофеина // *Вопросы химии и химической технологии* – 2009. – №2. – С. 89-91.
5. Teekachunhatean S., Tosri N., Rojanasthien N., Srichairatanakool S., Sangdee C. Pharmacokinetics of Caffeine following a Single Administration of Coffee Enema versus Oral Coffee Consumption in Healthy Male Subjects" // *International Scholarly Research Notices*, vol. 2013, Article ID 147238, 7 pages, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/147238>

УДК 577.323

Исследование специфичности нового класса лигандов к G-квадруплексам

В.А. Долгушева^{1,2}, В.В. Северов²

¹«МИРЭА – Российский технологический университет»

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медикобиологического агентства России

Интерес к G-квадруплексам (G4) обусловлен их широким регуляторным участием в таких биологических процессах, как транскрипция, репликация, рекомбинация и пр. С медицинской точки зрения, как мишени для лекарственного воздействия, наибольший интерес представляют G-квадруплексы, регулирующие экспрессию онкогенов, а также бактериальные и вирусные. В последние годы активно ведутся попытки поиска различных селективных лигандов для стабилизации данных структур [1-4]. Основным недостатком известных в настоящее время лигандов является то, что они в той или иной степени также связываются с другими структурами ДНК (например, B-формой) и не обладают селективностью в отношении конкретного G4.

Данная работа представляет собой попытку рационального дизайна сиквенс-специфических лигандов к G4. Повышение специфичности предполагалось обеспечить за счет «пришивки» к бензо[а]феноксазиновому производному, стекинующемуся с внешней тетрадой G4, компонентов к петлям квадруплекса с помощью клик-химии (рис.1.).

Взаимодействие полученных лигандов с различными G4 изучали с помощью спектроскопии кругового дихроизма, а также FRET-плавления. Показано, что они не взаимодействуют с дуплексными ДНК, а также антипараллельными G4. Неожиданным результатом явилось то, что они селективно, но не сиквенс-специфично связываются с параллельными G4, но при этом не оказывают какой-либо стабилизирующей или дестабилизирующей эффект.

Для получения «универсального» лиганда, распознающего параллельные G4, провели клик-реакцию бензо[а]феноксазинового производного не с компонентами к петлям, а с пропаргиловым спиртом (рис.2.). Показано, что производное также селективно распознает параллельные G4.

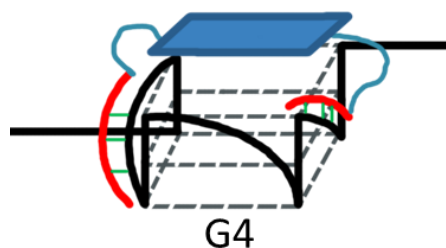


Рисунок 1. Схематическое изображение стекинга сиквенс-специфического лиганда с внешней тетрадой G4.

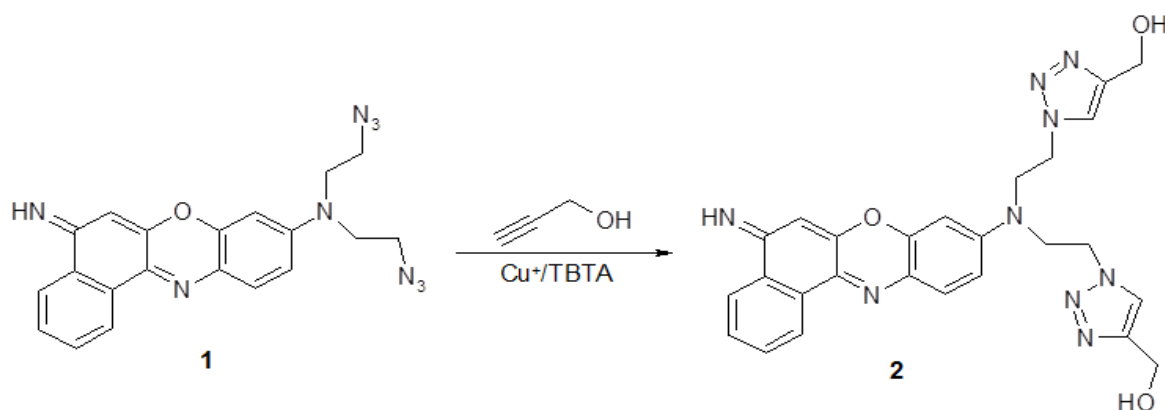


Рисунок 2. Реакция азид-алкинового циклоприсоединения бензо[а]феноксазинового производного (1) и пропаргилового спирта с получением продукта реакции (2).

Литература

1. *Hu M.-H. et. al.* Discovery of a fluorescent, long chain-bridged bispurine that selectively targets the c-MYC G-quadruplex. *Bioorg Chem.* 2022;122:105750.
2. *Gorai A. et. al.*Thiazole Containing PNA Mimic Regulates c-MYC Gene Expression through DNA G-Quadruplex. *Bioconjug. Chem.* 2022; 33(6):1145-1155.
3. *Wu. T.-Y. et. al.* A drug-like imidazole-benzothiazole conjugate inhibits malignant melanoma by stabilizing the c-MYC G-quadruplex. *Bioorg. Chem.* 2020; 99:103866.
4. *Belmonte-Reche E. et. al.* Thiosugar naphthalene diimide conjugates: G-quadruplex ligands with antiparasitic and anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2022; 232:114183.

Изучение фармакокинетики ингибитора TGF-beta рецептора A83-01

А.А. Кухнинова¹, В.А. Дюдина¹, А.С. Силантьев², А.Б. Воловецкий²

¹Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева

²Первый Московский государственный университет имени И.М. Сеченова
(Сеченовский университет)

³Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина федерального медико-биологического агентства России

Трансформирующий фактор роста бета (TGF-beta) – белок, выделяемый клеткой во внеклеточную среду. Он контролирует пролиферацию, клеточную дифференциацию и другие функции в большинстве клеток [1]. В нормальных клетках TGF-beta, действуя через свой сигнальный путь, блокирует клеточный цикл, останавливая пролиферацию. Когда клетка становится раковой, участки сигнального пути TGF-beta мутируют и больше не контролируют эту клетку [2], которая в свою очередь увеличивает производство TGF-beta. Это приводит к супрессии иммунного ответа и ангиогенезу, что делает рак более «агрессивным». Данный факт актуализирует использование ингибиторов TGF-beta рецепторов для подавления метастатического потенциала опухолей после их рецекции и на данный момент наиболее актуально в онкоурологии. A83-01 является производным A77-01 предназначенным для перорального введения, в исследованиях на мышах показал достаточную эффективность в подавлении метастазов, однако фармакокинетических исследований с выявлением дозировок в мочевом пузыре проведено не было.

Целью данной работы является изучение фармакокинетики A-83-01 в органах и тканях мышей, в том числе мочевом пузыре.

В исследованиях на мышах конечная дозировка была 2 мг A83-01 в мышь. Раствор вводили перорально напрямую в желудок с помощью ветеринарного питательного зонда. В качестве контрольной группы были использованы 3 животных, которым введен соответствующий объем 2% крахмала в физиологическом растворе без ингибитора A-83-01. После введения ингибитора животных через 0,5; 1; 2; 3; 4; 8; 12 и 24 часа забирали кровь из ретроорбитального синуса, а затем выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации. Кровь сразу центрифугировали (5 минут 500 G) с выделением плазмы, а препарирование проводили с извлечением печени, почек, селезенки, мышц, мочевого пузыря, сердца и мозга. К предварительно взвешенной пробе органов было внесено 1 мл охлажденного раствора метанола, содержащего внутренний стандарт (верапамил+резерпин). Пробы органов были подвергнуты гомогенизации с использованием BeadBeater в течение 30 секунд. После окончания гомогенизации пробы были помещены на вортекс на 5 секунд, после чего помещались на термошейкер при 1500rpm 15°C на 10 минут. После окончания инкубации каждая проба была подвергнута центрифугированию на малых оборотах в течение 15 секунд для осаждения дебриса. От пробы было отобрано 500 мкл супернатанта, который был перенесен в промаркированные эппендорфы. Далее для отделения белка пробы подвергались центрифугированию: мягкие образцы 4000 об/мин, 10°C, 3 минуты; плотные - 13000 об/мин, 10°C, 10 минут. Для исследования ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения супернатант переносили в вials: мягкие органы с аликвотой 500 мкл, плотные – 350 мкл, плазма – 50 мкл. Для проведения анализа был использован тандемный времяпролетный масс-спектрометр SCIEX 6600QTOF совмещенный с жидкостным хроматографом Exion AD. Для обработки результатов проведенного анализа было использовано ПО Skyline. Для поиска предполагаемых метаболитов было использовано ПО Sciex Metabolite Pilot и библиотека RDkit. С использованием Sciex Metabolite Pilot была проведена оценка 47 реакций для первой фазы метаболизма и 24 для второй фазы метаболизма для анализируемых веществ.

Для A-83-01 установлено образование гидроксильированного производного и предположительно установлен продукт его последующей конъюгации с глюкуроновой кислотой. Процент от введенной дозы для A-83-01 достигающий тканей мочевого пузыря незначителен и составляет ~0,1% от принимаемой перорально дозы. Пиковая концентрации для A-83-01 в тканях мочевого пузыря при пероральном введении наблюдается в диапазоне 0.5–3 часов после приема внутрь. Препарат сохраняется

в организме животных на протяжении 12 часов, через 24 часа отмечается полное выведение и биодegradация. Концентрация А-77-01 в плазме модельных животных ассоциирована с концентрацией А-83-01 и предположительно связана с его образованием из последнего.

Работа выполнена при поддержке Мегагранта "Тераностика в урологической онкологии" № 075-15-2019-1927 (2019-2021)

Литература

1. Minowa T., Kawano K., Kuribayashi H., Shiraishi K., Sugino T., Hattori Y., Yokoyama M., Maitani Y. Increase in tumour permeability following TGF-beta type I receptor-inhibitor treatment observed by dynamic contrast-enhanced MRI. *Br J Cancer*. 2009 Dec 1;101(11):1884-90. doi: 10.1038/sj.bjc.6605367. Epub 2009 Nov 3. PMID: 19888220; PMCID: PMC2788254.

2. Jakowlew S.B. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Sep;25(3):435-57. doi: 10.1007/s10555-006-9006-2. PMID: 16951986.

УДК 615.015.21

Доклинические исследования эффективности апротинина и его комбинаций с противовирусными препаратами, в области лечения гриппа.

И.А. Иващенко

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Актуальность исследования обусловлена регулярным появлением эпидемий и пандемий вирусных инфекций, устойчивых к существующим противовирусным препаратам. Грипп является одной из самых актуальных проблем здравоохранения. Им ежегодно поражается около 10% населения земного шара. Наиболее распространенные осложнения гриппа включают вирусную или бактериальную пневмонию, от которой ежегодно умирает около полумиллиона человек [1]. По оценкам Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC), грипп привел к 29-41 миллиону заболеваний, 380-710 тыс. госпитализаций и 22-38 тыс. смертей ежегодно в период с 2010 по 2020 год. В структуре инфекционной заболеваемости грипп составляет до 90-95% случаев от зарегистрированных в России инфекционных заболеваний. В зависимости от интенсивности и этиологии эпидемии доля случаев гриппа в структуре заболеваемости ОРВИ отмечается на уровне от 10 до 60%.

Предыдущие исследования показали, что апротинин (APR) ингибирует широкий спектр вирусов гриппа А (IAV) и вирусов гриппа В (IBV). Противогриппозная вирусная активность включает сезонные IAV человека (подтипы H1N1 и H3N2): A/CA/04/09 (H1N1) [2], A/PR/8/34 (H1N1) [4,5,6], A/WSN/34 (H1N1) [3], A/CA/04/09 (pH1N1), A/Hamburg/05/2009 (pH1N1) [5], A/Aichi/2/68 (H3N2) [4,6,7] и A/PH/2/82 (H3N2) [4]; птичий грипп A/AB/Kor/CN2/09 (H5N2), A/AB/Kor/CN05/09 (H6N5) и A/Ck/Kor/01310/01 (H9N2) [4]; IAV, устойчивый к осельтамивиру: A/Bris/10/07 H3N2 [7]; IBV В/Сеул/32/2011 [4], В/Гонконг/73 [8] и В/Ли/40 [19]. APR ингибируя трансмембранную протеазу TMPRSS2, расщепляющую белок и инициирующую процесс проникновения вируса гриппа в клетки-мишени, эффективно подавляет протеолиз, таким образом препятствуя проникновению вируса в клетки-мишени. Вироцидное действие APR против гриппа H1N1 продемонстрировало свою эффективность в экспериментах и клинике [5]. Следует отметить, что аэрозоль на основе APR, запатентованный в 2010 году для лечения вирусных респираторных инфекций [9], был одобрен в России для лечения гриппа [10].

Цель исследования получить информацию об эффективности применения апротинина и его комбинаций с другими противовирусными препаратами для лечения инфекций, вызванных вирусом гриппа. В работе использовались следующие противовирусные препараты и их комбинации: APR с активностью 5400 КИЕ/мг от Wanhua Biochem (Наньчан, Китай), Molnupiravir (MOV) от Jiangsu Zenji Pharmaceuticals Ltd. (Хуайань, Китай), Nilmatrelvir (NMV) от Shanghai XingMo Biotechnology Co. Ltd. (Шанхай, Китай), Favipiravir (FVP) от Zenji Pharmaceuticals (Сучжоу) Ltd. (Сучжоу, Китай), Remdesivir

(RDV) от Zenji Pharmaceuticals (Suzhou) Ltd. (Сучжоу, Китай), кандидат на противогриппозный препарат AV5080, APR + RDV, APR + MOV, APR + NMV, APR + FVP, APR + RDV, APR + AV5080. Исследование эффективности проходило на модели гриппозной пневмонии мышей. Самки мышей BALB/c весом 12-14 г были инфицированы вирусом гриппа A/CA/04/2009 (H1N1).

Полученные результаты исследования показали, что лечение APR в комбинации с другими противовирусными препаратами оказало синергетический эффект. Комбинации препаратов оказались значительно более эффективны, чем отдельные компоненты, с точки зрения выживаемости (рис. 1), динамики снижения массы тела (рис. 2), значения титра вируса гриппа в легких мыши через 5 дней после заражения.

Результаты исследования продемонстрировали целесообразность клинической оценки комбинированной терапии APR и противовирусными препаратами (RDV, MOV, FVP и NMV) при заболеваниях, вызываемых вирусами гриппа, в частности пневмонией. Результаты работы также стали основанием для изучения липосомальных форм APR, которые позволят разработать инновационные готовые лекарственные формы, значительно улучшающие таргетную доставку действующих веществ.

Рисунок 1. Выживаемость мышей при лечении препаратом при заражении вирусом гриппа A/CA/04/2009 (H1N1)

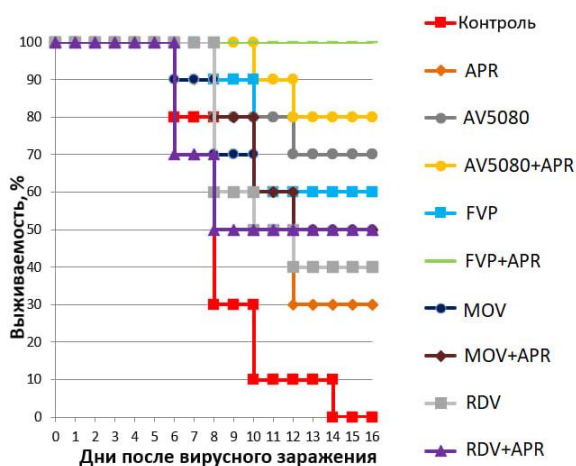
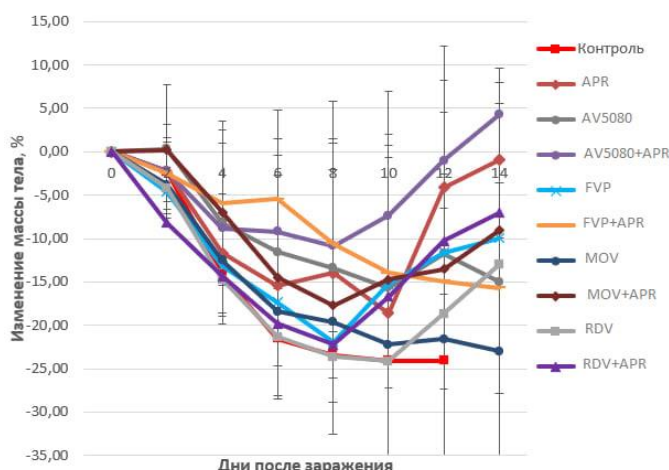


Рисунок 2. Изменение массы тела мышей при лечении препаратом при заражении вирусом гриппа A/CA/04/2009 (H1N1)



Литература

1. Javanian M., Barary M., Ghebrehewet S., Koppolu V., Vasigala V.K.R., Ebrahimpour S. A brief review of influenza virus infection. J. Med. Virol. 2021
2. Bertram S., Heurich A., Lavender H., Gierer S., Danisch S., Perin P., Lucas J.M., Nelson P.S., Pöhlmann S., Soilleux E.J. Influenza and SARS-coronavirus activating proteases TMPRSS2 and HAT are expressed at multiple sites in human respiratory and gastrointestinal tracts. PLoS ONE 2012

3. *Zhirnov O.P., Ikizler M.R., Wright P.F.* Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J. Virol.* 2002
4. *Song E.-J., Españo E., Shim S.-M., Nam J.-H., Kim J., Lee K., Park S.-K., Lee C.-K., Kim J.-K.* Inhibitory effects of aprotinin on influenza A and B viruses in vitro and in vivo. *Sci. Rep.* 2021
5. *Zhirnov O.P., Matrosovich T.Y., Matrosovich M.N., Klenk H.-D.* Aprotinin, a protease inhibitor, suppresses proteolytic activation of pandemic H1N1v influenza virus. *Antivir. Chem. Chemother.* 2011, 21, 169–174.
6. *Zhirnov O.P., Ovcharenko A.V., Bukrinskaya A.G.* Suppression of Influenza Virus Replication in Infected Mice by Protease Inhibitors. *J. Gen. Virol.* 1984, 65, 191–196.
7. *Zhirnov O.P., Ikizler M.R., Wright P.F.* Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J. Virol.* 2002
8. *Zhirnov O.P., Golyando P.B., Ovcharenko A.V.* Replication of influenza B virus in chicken embryos is suppressed by exogenous aprotinin. *Arch. Virol.* 1994, 135, 209–216.
9. *Zhirnov O.P., Khanykov A.V.* Aprotinin-Based Aerosol Preparation for the Treatment of Viral Respiratory Infections. WO/2012/008869, 15 July 2010.
10. *Ханыков А.В.* Индивидуальный ингалятор Аэрус® в лечении гриппа и ОРВИ на ранних стадиях - безопасность, стабильность, эффективность. *ЖурналПоликлиника.* 2012 г.

Создание пациент-специфичной клеточной модели ткани предсердий человека

**Т.О. Сергеева¹, А.К. Бережной¹, М.М. Слотвицкий¹, В.А. Цвеляя^{1,2}, А.А. Аитова¹,
К.И. Агладзе^{1,2}**

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»

Одним из наиболее распространенных заболеваний сердечно-сосудистой системы является персистирующая форма фибрилляции предсердий (ФП) – нарушения ритма сердца, приводящего к развитию сердечной недостаточности и внезапной сердечной смерти [1, 2]. Распространенным методом лечения ФП является хирургическая абляция – создание в ткани предсердия непроводящих зон топологии, способной предотвратить возникновение и развитие спиральных волн реентри.

В данной работе описано создание системы помощи врачу при проведении хирургических абляций, позволяющее повысить эффективность процедуры. В основе системы лежит учёт гистологического анализа морфологии предсердной ткани. По результатам анализа создается математическая модель ткани предсердий пациента.

Математическая модель морфологии клеток основана на клеточной модели Поттса [3, 4]. Электромеханическая функция сердца выполняется возбудимыми клетками – кардиомиоцитами, которые генерируют потенциал действия и механическое сокращение. Взаимодействие между кардиомиоцитами, невозбудимыми фибробластами и внеклеточными белками формирует сложную текстуру ткани.

В ходе разработки модели выполняются следующие задачи:

1. Получение, иммуногистохимический анализ и конфокальная микроскопия срезов предсердной ткани пациентов с фиброзом и без. Окрашивание тонких срезов осуществляется красителями DAPI, f-actin, α -actinin для оценки количественного и структурного анализа морфологии клеток;
2. Разработка модели морфологии монослоя сердечной ткани по данным срезов пациентов с учетом наблюдаемых и варьируемых (итерационных) параметров морфологии;
3. Адаптация предсердной модели по данным электрофизиологии клеточного материала пациентов (полученных с помощью метода patch-clamp и оптического картирования).

Литература

1. Verma M.S., Terricabras M., Verma A. The Cutting Edge of Atrial Fibrillation Ablation. *Arrhythm Electrophysiol Rev.* 2021 Jul;10(2):101-107. doi: 10.15420/aer.2020.40. PMID: 34401182; PMCID: PMC8335866.
2. Wang H. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 //The lancet. – 2016. – Т. 388. – №. 10053. – С. 1459-1544.
3. Kudryashova N., Tsvelaya V., Agladze K. et al. Virtual cardiac monolayers for electrical wave propagation. *Sci Rep* 7, 7887, 2017, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07653-3>.
4. Marée A.F.M., Grieneisen V.A., Hogeweg P. The Cellular Potts Model and Biophysical Properties of Cells, Tissues and Morphogenesis. In: Anderson, A.R.A., Chaplain, M.A.J., Rejniak, K.A. (eds) *Single-Cell-Based Models in Biology and Medicine. Mathematics and Biosciences in Interaction.* Birkhäuser Basel. 2007. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8123-3_5.

Разработка пациент-специфичной системы коррективки абляции

**А.К. Бережной¹, М.М. Слотвицкий¹, В.А. Цвеляя^{1,3}, Т.О. Сергеева¹, В.Д. Наумов¹, А.И. Калинин¹,
В.А. Сыровнев², А.А. Аитова¹, К.И. Агладзе^{1,3}**

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет) ²ФГБУ «Клиническая больница №1» (Волынская) Управления делами Президента РФ

³Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области "Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского"

Согласно исследованиям Всемирной Организации, сердечно-сосудистые заболевания являются наиболее распространенной причиной смертности среди трудоспособного населения развитых стран [1, 2]. Высоко распространены фибрилляции предсердий (ФП), это заболевание поражает до 2% взрослого

населения развитых стран [2]. Прогнозирование и оценка риска возникновения аритмий (волн-реентри) является актуальной задачей для современного здравоохранения.

Основным методом лечения ФП является абляция – создание искусственных препятствий на поверхности ткани, призванных остановить возникновение и развитие спиральных волн. Однако процент рецидивов при проведении таких операций крайне высок: более половины пациентов возвращаются на повторную операцию [3], поскольку аритмия возникает повторно в новых условиях. Предметом данной работы является разработка пациент-специфичной модели сердечной ткани предсердий человека с учетом данных МРТ пациента и особенностей клеточной структуры сердечной ткани человека.

В основу модели электрофизиологии легли модели ТННП [4] и Поттса [5]. Первая показала себя как хорошо описывающая электрофизиологию кардиомиоцитов и аритмогенность ткани. В основе имитации лежит численное решение системы уравнений типа Ходжкина-Хаксли. Модель является изотропной, то есть не учитывает вклад структуры клеток в волновую динамику ткани. Вторая является моделью адгезии кардиомиоцитов на поверхность, отражает формирование монослоя человеческих сердечных клеток. Модель основана на варьировании гамильтониана клетки, параметры которого адаптированы на основе экспериментальных данных. На завершающем этапе разработки модель будет выстраивать карту предсердий пациента на основе данных его исследований и с учетом морфологии сердечной ткани предсердий моделировать волновую динамику в ткани, что позволит осуществлять более точный прогноз успеха протокола абляции.

На основе указанных моделей создана модель сердечной ткани с электрофизиологией, отвечающей параметрам предсердной ткани человека. После калибровки модели по данным гистологии предсердной ткани будет проведена работа по интеграции в модель МРТ данных, что делает модель пациент-специфичной.

Литература

1. Wang H. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 //The lancet. – 2016. – Т. 388. – №. 10053. – С. 1459-1544
2. Roth G.A., et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. // Circulation 132.17 (2015): 1667-1678
3. Долгинина С.И., Хохлунов С.М. Предикторы рецидива фибрилляции предсердий после ее катетерной абляции // Медицинский альманах. 2015. №3 (38).
4. Ten Tusscher K.H., Noble D., Noble P.J., Panfilov A.V. A model for human ventricular tissue. Am J Physiol Heart Circ Physiol 286: H1573–H1589, 2003.
5. Kudryashova N., Nizamieva A., Tsvelaya V., Panfilov A.V., Agladze K.I. Self-organization of conducting pathways explains electrical wave propagation in cardiac tissues with high fraction of non-conducting cells, <https://doi.org.10.1371/journal.pcbi.1006597>

УДК 577.35

Исследование аритмогенности препятствий различной топологии в анизотропной сердечной ткани

И.С. Семидетнов

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Электрические волны возбуждения распространяются по сердцу и инициируют его сокращение. Аномалии в распространении волны могут привести к сердечной аритмии. Согласно отчету, опубликованному Всемирной организацией здравоохранения, на сердечно-сосудистые заболевания приходится наибольшее количество смертей в мире, среди которых около 40% возникают внезапно и вызваны аритмиями. В настоящее время известно, что в основе большинства сердечных тахикардий лежат циркулирующие волны возбуждения – реентри. Зачастую, реентри образуются при изменении свойств проводимости ткани и на непроводящих участках, так называемых препятствиях.

В данной работе описано моделирование воздействия анизотропии в гетерогенной культуре на вероятность возникновения реентри. Компьютерное моделирование производилось для монослоя сердечных клеток крысы, аналогичного экспериментальной 2D модели сердечной ткани. Экспериментальная модель монослоя выглядит как клетки на волоконной подложке, что дает имитацию анизотропии. Модель включает смоделированное препятствие, которое было предложено ранее [1, 2]. Компьютерное моделирование происходило с помощью модели Корхонена [3],

описывающей крысиные клетки, с модификацией токов по их форме. Чтобы смоделировать токи и потенциал действия, мы подбирали формы токов, аналогичные экспериментальным данным Patch-Clamp [4], для этого использовалось варьирование переменных активации каналов.

В компьютерном моделировании удалось воспроизвести результат эксперимента, при котором на одной и той же частоте при вытягивании клеток вдоль волокон нет подскока, против волокон виден подскок (рис. 1). Подскок волны на препятствии – начальная точка образования реентри. Было проведено моделирование анизотропии в смоделированной ткани, а также получены условия возникновения реентри на препятствии при гетерогенности виртуальной ткани.

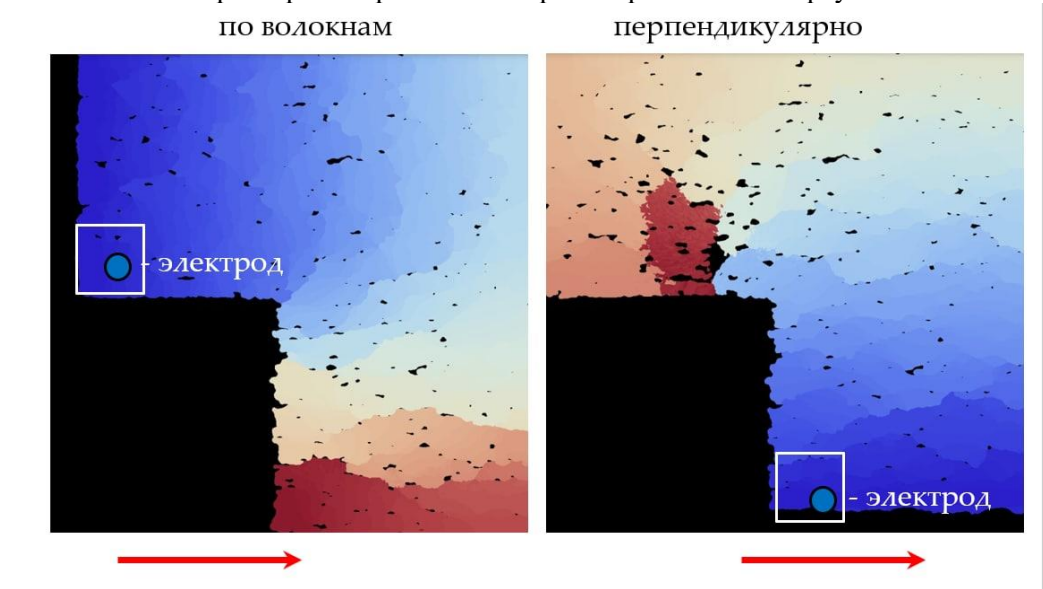


Рисунок 1. Компьютерное моделирование сердечной ткани и проведение по ней волн возбуждения с препятствием. Направление внешнего стимула вдоль волокон (слева), и перпендикулярно волокнам (справа). Красной стрелкой обозначено направление волокон. Распространение волны происходит от точки стимула электродом и ее фронт продемонстрирован от синего к красному.

Таким образом, в данной работе была разработана максимально приближенная по физиологическим характеристикам модель для исследования возникновения патологий и критических случаев проведения волн возбуждения на возбудимой ткани из кардиомиоцитов. Компьютерная модель однозначно показала увеличение коридора частот проявления критических случаев в случае появления анизотропии и анизотропных паттернов, что соответствует ряду паттернов в волокнистой структуре мышцы сердца.

Литература

1. Slotvitsky M. et al. Arrhythmogenicity test based on a human-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocyte layer //Toxicological Sciences. – 2019. – Т. 168. – №. 1. – С. 70-77.
2. Kadota S. et al. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets //European heart journal. – 2013. – Т. 34. – №. 15. – С. 1147-1156.
3. Korhonen T., Hänninen S.L., Tavi P. Model of excitation-contraction coupling of rat neonatal ventricular myocytes //Biophysical journal. – 2009. – Т. 96. – №. 3. – С. 1189-1209.
4. Podgurskaya A.D. et al. Effect of heptanol and ethanol on excitation wave propagation in a neonatal rat ventricular myocyte monolayer //Toxicology in Vitro. – 2018. – Т. 51. – С. 136-144.

УДК 577.35

Разработка алгоритма подбора параметров модели человеческой сердечной ткани

В.Д. Наумов

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Согласно исследованиям Всемирной Организации Здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания являются наиболее распространенной причиной смертности среди трудоспособного населения развитых стран [1, 2]. Наибольшую опасность представляют желудочковые фибрилляции, приводящие к смерти от остановки сердца. Прогнозирование и оценка риска возникновения волн-реентри является актуальной задачей для современного здравоохранения.

Ранее в Лаборатории возбудимых систем МФТИ была создана математическая модель сердечной ткани желудочка, учитывающая морфологию ткани и клеток. В ее основу легла клеточная модель Поттса, использующая метод Монте-Карло, варьирование гамильтониана, подобранного по результатам экспериментов [3].

Целью данной работы было создание модели формирования слоя человеческих кардиомиоцитов с начала дифференцировки до момента созревания для исследования процессов возникновения патологий, приводящих к реентри. Основной задачей проекта является создание алгоритма подбора параметров модели Поттса, достоверно реализующих морфологию как отдельных клеток, так и ткани кардиомиоцитов, полученных из iPСК человека. Для этого были выбраны и измерены основные метрики, связанные с морфологией клеток (площадь, площадь описанного многоугольника, длина, ширина, удлинение и др.). Снимки с конфокального микроскопа были обработаны в программе ImageJ. Были написаны алгоритмы, измеряющие метрики клеток на массивах, полученных в результате моделирования. Обработка производилась с помощью библиотек scikit-image и feret, написанных на языке Python. Были составлены таблицы данных: экспериментальные и полученные моделированием. Были проверены и подтверждены несколько гипотез о зависимости метрик от параметров модели. На итоговой модели в зависимости от параметров морфологии была получена неоднородность потенциала действия внутри образца. Активационная карта показала искривление переднего фронта волны при распространении по образцу (рис. 1). То есть было показано, что искривление фронта не может объясняться только граничными условиями.

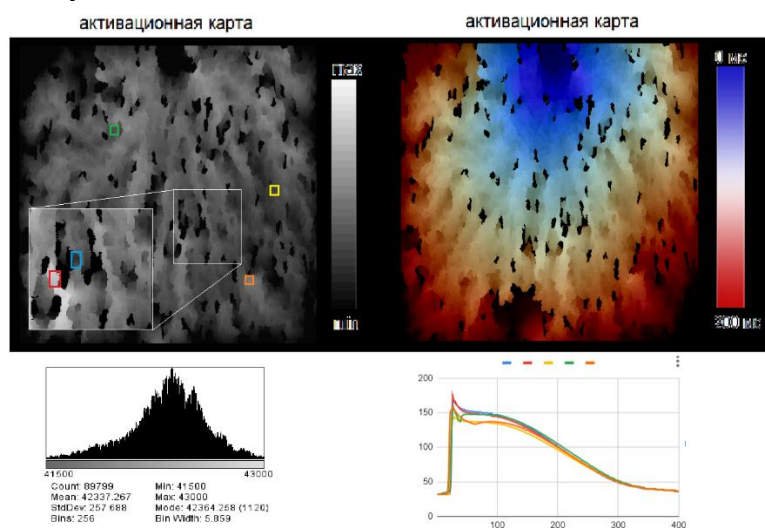


Рисунок 1. Карта морфологии ПД (слева) и активационная карта (справа) для волны возбуждения, запущенной импульсом в центре верхнего края образца. На диаграмме внизу слева представлен разброс значений S в образце, внизу справа приведены примеры ПД из разных частей образца (показанных разноцветными прямоугольниками на карте слева сверху).

Таким образом, в работе были достигнуты следующие результаты:

- Была создана компьютерная модель виртуальной сердечной ткани пациентов в 2D с учетом морфологических данных
- Была составлена база данных морфологических особенностей сердечных клеток разных типов в зависимости от анамнеза человека

В дальнейшем, планируется изучить влияние остальных параметров на данные метрики и реализовать алгоритм, использующий современные методы, для поиска параметров модели, который сможет достоверно реализовывать морфологию сердечной ткани конкретного пациента, то есть: автоматизировать процесс калибровки модели и сделать модель пациент-специфичной.

Литература

1. Wang H. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 //The lancet. – 2016. – Т. 388. – №. 10053. – С. 1459-1544
2. Roth G.A., et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. Circulation 132.17 (2015): 1667-1678

УДК 577.352.335

Определение упругих параметров липидных мембран путем измерения профилей латерального давления с помощью молекулярного моделирования

М.А. Калуцкий¹, Т.Р. Галимзянов¹, К.В. Пинигин^{2,3}

¹Национальный исследовательский технологический университет МИСИС

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

³Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН

В живых клетках липидные мембраны служат слабопроницаемой границей, благодаря которой осуществляется компартментализация различных клеточных органелл и отделение клеток от внешней среды. Известно, что ряд клеточных процессов, таких как эндоцитоз, экзоцитоз, проникновение и высвобождение вирусов, встраивание белков в мембрану, мембранно-опосредованное взаимодействие между мембранными включениями, порообразование, образование липидных жидко-упорядоченных доменов, сопряжены с деформациями липидных мембран. Данные деформации могут быть описаны с помощью теории упругости, в рамках которой липидная мембрана рассматривается как непрерывная упругая среда жидкая в латеральном направлении. Уравнение состояния липидной мембраны задается с помощью функционала упругой энергии, определяющего связь между возникающими деформациями и работой, необходимой для их осуществления. Важную роль в описании мембранных деформаций играют упругие параметры липидных мембран, так как от упругих параметров зависят энергетические барьеры процессов, задействующих деформации мембран, и, соответственно, характерные времена протекания этих процессов. Так как липидный состав клеточных мембран является многокомпонентным, особый интерес представляет зависимость упругих параметров мембран от липидного состава. Вариация липидного состава может приводить к изменению упругих параметров мембран, что может использоваться клетками для регуляции процессов, связанных с деформациями мембран.

Измерение упругих параметров многокомпонентных мембран осложнено в связи с эффектом сопряжения липидного состава и кривизны, приводящего к перераспределению липидов в области с различной кривизной при изгибе мембраны. Данный эффект затрудняет определение собственных упругих параметров липидных смесей, то есть таких параметров, которые соответствуют изгибу с постоянной кривизной без перераспределения липидов. Данная проблема может быть решена с помощью рассмотрения плоских липидных бислоев. В работе [1] Campelo и др. был предложен метод определения упругих параметров липидных мембран, основанный на измерении локального модуля растяжения-сжатия из зависимости профилей латерального давления плоских липидных бислоев от латерального натяжения. В работе [2] нами существенно пересмотрен и обобщен метод, предложенный в работе [1]. Показано, что определение упругих параметров может быть значительно упрощено путем измерения производных от моментов локального натяжения по растяжению вместо измерения локального модуля растяжения-сжатия. Учет условия глобальной несжимаемости липидных монослоев, являющегося более общим по сравнению с условием локальной несжимаемости, позволило определить локальный коэффициент Пуассона, отвечающий за масштабирование профилей латерального давления при латеральном растяжении и сжатии бислоя и позволяющий более точно измерять упругие параметры. Показано, что теория работы [1] нуждается в существенной поправке, не учет которой может приводить к систематической ошибке измеряемых упругих параметров, достигающей примерно 25%. В случае предположения локальной несжимаемости и квадратичной упругой энергии теоретически получено соотношение между модулем гауссовой кривизны как функции растяжения и модулем изгиба, являющееся обобщением на случай изгибной деформации классического соотношения между латеральным натяжением и модулем растяжения-сжатия.

Известно, что различные липиды имеют разные упругие параметры. Например, модуль изгиба насыщенных липидов обычно больше чем у ненасыщенных. Также, липиды могут иметь разную спонтанную кривизну в зависимости от пространственных размеров гидрофильной и гидрофобной части. В связи с этим, многокомпонентные липидные мембраны могут иметь разные упругие параметры в зависимости от концентрации тех или иных липидов. При практических применениях теории упругости для расчета энергии деформации многокомпонентных липидных мембран обычно

используется предположение аддитивности упругих параметров. Так, в случае спонтанной кривизны аддитивность предполагает линейную зависимость спонтанной кривизны от концентрации липидов, а в случае модуля изгиба обычно используется усреднение Ройса — предположение о линейности обратного модуля изгиба от концентрации липидов. Тем не менее, остается неисследованным вопрос о корректности применения предположения аддитивности к упругим параметрам многокомпонентных липидных мембран. Для исследования данного вопроса предложенный метод был применен к двухкомпонентной смеси липидов. В качестве примера были рассмотрены липиды с разными упругими параметрами, для двухкомпонентной смеси которых можно ожидать изменение упругих параметров в зависимости от концентрации липидов: дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) и диолеоилфосфатидилхолин (ДОФХ). ДПФХ является насыщенным липидом с сильной упорядоченностью углеводородных цепей и большим модулем изгиба, а ДОФХ ненасыщенным липидом со слабой упорядоченностью углеводородных цепей и меньшим модулем изгиба по сравнению с ДПФХ. Были определены следующие упругие параметры мембран из данных липидов: монослойный модуль изгиба, монослойный модуль растяжения-сжатия, монослойная спонтанная кривизна и положение нейтральной поверхности. Показано, что зависимость монослойной спонтанной кривизны и модуля изгиба двухкомпонентной липидной мембраны из ДПФХ и ДОФХ от концентрации липидов носит нелинейный характер, а модуль изгиба не подчиняется классическому усреднению Ройса.

Таким образом, в данной работе разработан молекулярно-динамический метод, позволяющий определять собственные упругие параметры многокомпонентных липидных мембран путем измерения зависимости латерального давления плоских липидных бислоев от латерального натяжения. На примере двухкомпонентной смеси ДПФХ/ДОФХ показано, что упругие параметры многокомпонентных липидных мембран могут существенно отличаться от значений, следующих из предположения аддитивности упругих параметров.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 22-24-00661).

Литература

1. Kalutskii M.A., Galimzyanov T.R., Pinigin K.V. Determination of elastic parameters of lipid membranes from simulation under varied external pressure // Phys. Rev. E. 2023. V. 107. P. 024414.
2. Campelo F., Arnarez C., Marrink S.J., Kozlov M.M. Helfrich model of membrane bending: From Gibbs theory of liquid interfaces to membranes as thick anisotropic elastic layers // Adv. Colloid Interface Sci. 2014. V. 208. P. 25.

УДК 612.822.3

Энтропийный подход к предсказанию эффективности стимуляции глубинных структур мозга у пациентов с болезнью Паркинсона

Захаров Н.И.^{1,2}, Белова Е.М.², Седов А.С.^{1,2}

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

² Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова РАН

Реализован метод [1] энтропийного анализа записей импульсной активности нейронов субталамического ядра головного мозга пациентов с болезнью Паркинсона. Расчет информационной энтропии Шеннона производился по формуле:

$$S = -\sum_i P(x_i) \ln(P(x_i)) \quad (1)$$

где:

x_i – случайное событие, представляющее собой набор символов из «--», «-», «о», «+», «++» заданной длины. Каждый из символов показывает степень отличия соседних межспайковых расстояний (межспайковое расстояние (Interspike Interval; ISI) – расстояние между двумя соседними импульсиями; рассматривается ISI_{i+1} в сравнении с ISI_i) рассчитанную по следующему принципу:

«--»: $ISI_{i+1} < 30\% ISI_i$

«-»: $30\% ISI_i \leq ISI_{i+1} < 90\% ISI_i$

«о»: $90\% ISI_i \leq ISI_{i+1} \leq 110\% ISI_i$

«+»: $110\% ISI_i < ISI_{i+1} \leq 170\% ISI_i$

«++»: $170\% ISI_i < ISI_{i+1}$

$P(x_i)$ – вероятность наблюдения в строке относительных изменений межспайковых расстояний (строится на основе записи импульсной активности нейронов) события x_i , определяемая как

отношение числа вхождений набора x_i в строку относительных изменений межспайковых расстояний.

Данный метод был использован для определения отличий в активности одиночных нейронов между выбранными и проигнорированными траекториями для установки DBS-электрода в субталамическом ядре у пациентов с болезнью Паркинсона во время операций.

Результаты расчета информационной энтропии описанным способом показали статистически значимое снижение энтропии для траекторий, выбранных для установки DBS-электрода во время операций (рис. 1 (а)). Для получения достоверных отличий достаточно рассмотрения элементарных событий x_i длиной в 2 символа (рис. 1 (б)). Рассчитанное значение энтропии показало слабую корреляцию с другими известными параметрами одиночной активности нейронов [2, 3, 4, 5].

Таким образом показана возможность использования информационной энтропии Шеннона как дополнительного параметра исследования одиночной активности нейронов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 22-15-00344).

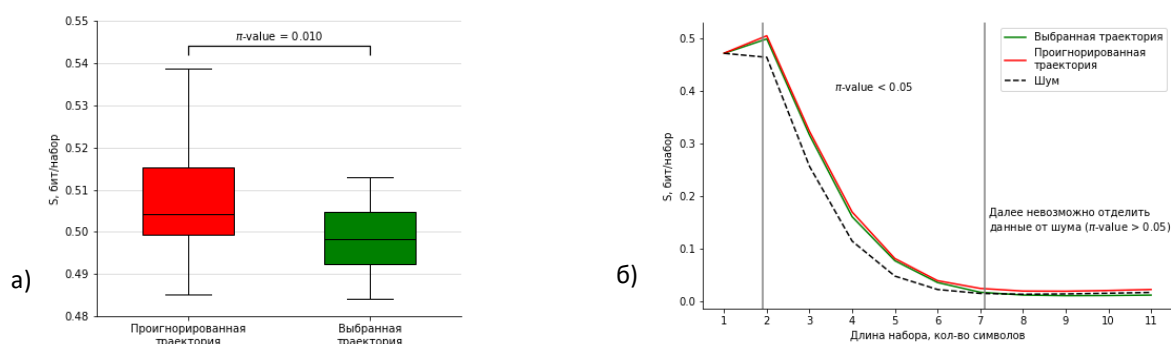


Рисунок 1. а) Сравнение информационной энтропии при длине набора 2 для проигнорированной и выбранной траектории; б) Зависимость информационной энтропии от длины набора, используемого для расчета

Литература

1. Sherry C.J., Klemm W.R. Entropy as an Index of the Informational State of Neurons // Int. J. Neurosci. 1981. V. 15. P. 171.
2. Koirala N., Serrano L., Paschen S. et al. Mapping of subthalamic nucleus using microelectrode recordings during deep brain stimulation // Sci Rep. 2020. V. 10. P. 19241.
3. Myrov V., Sedov A., Salova E., Tomskiy A., Belova E. Single unit activity of subthalamic nucleus of patients with Parkinson's disease under local and generalized anaesthesia: Multifactor analysis // Neurosci Res. 2019. V. 145. P. 54.
4. Myrov V., Sedov A., Tomskiy A., Myrova L., Belova E. Chapter 25 - A new approach for estimation of spiketrain patterns in basal ganglia // Prog Brain Res. 2019. V. 249. P. 321.
5. Belova E., Filyushkina V., Dzhalongiia I., Gamaley A., Tomskiy., Neumann. W.-J., Sedov A. Oscillations of pause-burst neurons in the STN correlate with the severity of motor signs in Parkinson's disease // Exp. Neurol. 2022. V. 356. P. 114155.

УДК 577.352.5

Изучение влияния нового кардиопротекторного соединения нитропроизводного сукцината этилметилгидроксипиридиния на ионные каналы кардиомиоцитов

В.К. Крамкова¹, С.Г. Коваленко^{1,2}, Ш.Р. Фролова^{1,2}, Д.В. Мищенко^{3,4,5}, А.А. Балакина^{3,4}, К.И. Агладзе^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского

³Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН,

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

⁵Научно-образовательный центр в г. Черноголовка Московского государственного областного университета

В настоящее время изучение возникновения аритмий и способов борьбы с ними является очень актуальным направлением. Одной из причин возникновения аритмий является ишемическая болезнь сердца (ИБС). ИБС часто сопровождается интенсификацией процессов оксидативного

стресса, при котором свободные радикалы окисляют липиды мембран кардиомиоцитов. Известно также, что монооксид азота (NO) играет важную роль в регуляции тонуса сосудов, однако высокое содержание окисленных липидов может приводить к ингибированию синтеза NO в организме. Для профилактики заболеваний, связанных с оксидативным стрессом, используются препараты с антиоксидантной активностью. Новое соединение, синтезированное в Федеральном исследовательском центре проблем химической физики и медицинской химии РАН, нитропроизводное сукцината этилметилгидроксипиридиния (ЭМГПС-NO) [1] обладает антиоксидантными и NO-донирующими свойствами в клетках сердца, а также способно защищать железосерные центры дыхательной цепи митохондрий сердца, мозга и печени в тканях животных от окислительного стресса [2].

В связи с тем, что в сердечно-сосудистой системе за генерацию потенциала действия для проведения возбуждения в сердце ответственны ионные каналы, это исследование было направлено на изучение влияния нового соединения ЭМГПС-NO на потенциалзависимые ионные каналы кардиомиоцитов, играющие главную роль в формировании потенциала действия.

Целью нашего исследования было изучение влияния ЭМГПС-NO на работу потенциалзависимых быстрых натриевых каналов Nav1.5 и быстрых кальциевых каналов Cav, L-типе кардиомиоцитов.

Исследование было проведено электрофизиологическим методом пэтч-кламп в конфигурации «перфорированная целая клетка» на изолированных неонатальных кардиомиоцитах новорожденных крысят.

Установлено, что в концентрации до 1 мМ ЭМГПС-NO не оказывает влияния на работу быстрых натриевых каналов Nav1.5 и быстрых кальциевых каналов Cav, L-типе. В концентрации выше 1 мМ наблюдалось подавление быстрых натриевых токов $I_{Nav1.5}$ (рис.1) и быстрых кальциевых токов $I_{Cav, L-типе}$.

В результате было показано, что в концентрациях, в которых ЭМГПС-NO оказывает антиоксидантные свойства ($20-160 \text{ мкМ} \cdot \text{л}^{-1}$) [3], не оказывает влияния на работу быстрых натриевых каналов Nav1.5 и быстрых кальциевых каналов Cav, L-типе. А в концентрациях начиная с 1 мМ подавляет данные ионные токи дозозависимым способом.

Вывод: Показано, в качестве мембранопротекторного соединения ЭМГПС-NO может использоваться в терапевтических дозах без побочных действий на потенциалзависимые ионные каналы кардиомиоцитов, такие как Nav1.5 и Cav, L-типе.

Исследование на потенциалзависимые калиевые ионные каналы продолжается.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, № АААА-А19-119071890015-5, № АААА-А19-119071890015-6

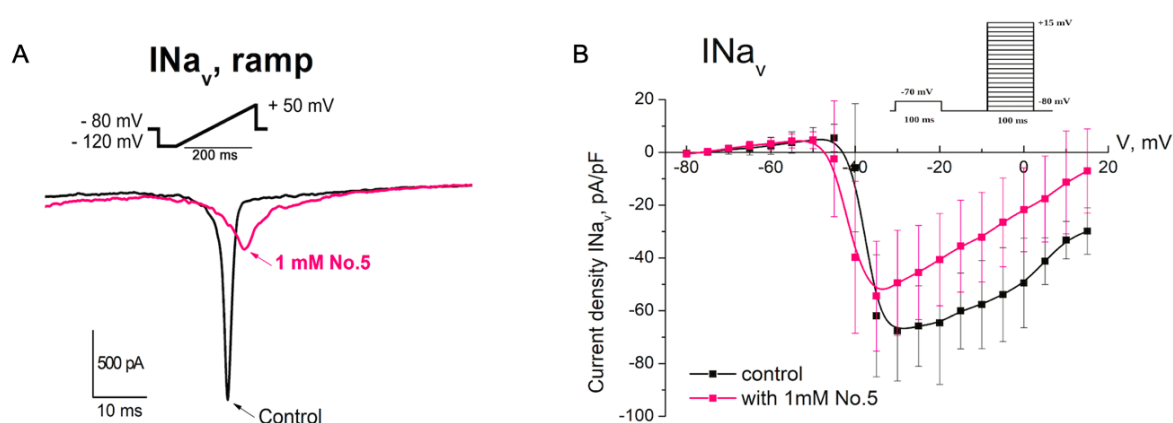


Рисунок 1. Измерение тока Na-канала в контроле (n=5) и под веществом (n=8)

Литература

1. Федоров Б.С. и др. НИТРОКСИСУКЦИНАТ2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ОКСИПИРИДИНА (варианты использования) способ его получения// Патент RU 2394815 С2. Номер заявки: 2008105229/04. 20.07.2010 Бюл. №20.
2. Богатыренко Т.Н., Куроптева З.В., Байдер Л.М., Богатыренко В.Р., Мищенко Д.В. Нитроксисукцинат 3-гидрокси-6-метил-2-этилпиридина — гибридная структура с полифункциональным действием. Известия Академии наук. Серия химическая, № 10, 2020.

3. Приходченко Т.Р., Балакина А.А., Амозова В.И., Гадамский С.Я., Мищенко Д.В. Антиоксидантные свойства нитроксисукцината 3-гидрокси-6-метил-2- этилпиридиния при активации окислительных процессов противоопухолевым препаратом цисплатин in vitro и in vivo. Известия Академии наук. Серия химическая, № 12, 2022.

УДК 577.359

Исследование возникновения аритмогенных эффектов на сердечной ткани с различными патологиями.

А.А. Аитова¹, С.А. Щербина¹, М.М. Слотвицкий¹, В.А. Цвеляя¹, К.И. Агладзе¹ф

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Ключевые слова: внезапная сердечная смерть, аритмия, оптическое картирование, стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, кардиомиоциты, гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП), анизотропия

Внезапная сердечная смерть (ВСС) является фатальным событием и составляет порядка 25% причин гибели людей до 65 лет, не страдающих диагностированными сердечными заболеваниями. По последним данным, в РФ от сердечных болезней ежегодно умирает 200 000 - 250 000 человек. Риск развития ВСС повышается при наличии кардиомиопатий и нарушениях насосной функции сердца. Несмотря на активное развитие диагностических технологий, до сих пор не разработан метод, позволяющий достоверно и с высокой точностью предсказать вероятность развития ВСС. Целью данной работы является разработка такого метода и определение вероятности возникновения аритмогенных эффектов при различных условиях формирования и развития сердечной ткани. В работе наблюдалось in vitro формирование ткани из дифференцирующихся в кардиомиоциты индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) конкретных пациентов при различных смоделированных условиях. Были рассмотрены различия в формировании аритмий в контроле без врожденных патологий и для врожденной гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП, мутация R326Q в MYBPC3) с поиском условий, при которых она не проявляется.

Для определения вероятности возникновения аритмогенных эффектов на ткани, на основе тестирования со стандартизованным препятствием [1] была смоделирована система, которая бы давала более широкий коридор критических частот для возникновения волн реентри, являющаяся основной причиной аритмий в случае 2D ткани. Такая система была создана на основе структурных неоднородностей. Для увеличения коридора критических случаев, при которых реентри возникает, в данной работе изменили структуру самого образца с угловым препятствием за счет направленных и хаотичных волокон (рис.1). Были протестированы различные анизотропные и изотропные структуры. Эти структуры были протестированы и в сравнении для формирования ткани из дифференцирующихся в кардиомиоциты ИПСК для линий с врожденной мутацией и без нее. Для моделирования волоконных структур использовался метод электроспиннинга (Nanon-01). Базовым протоколом для дифференцировки был протокол активации сигнального пути WNT/ β -катенин с помощью CHIR99021 и его последующем ингибировании [2, 3]. Кальциевая и электрофизиологическая активность полученных кардиомиоцитов проверялась методом оптического картирования с помощью кальций-зависимых и потенциал-зависимых красителей. Проверялось формирование непосредственно клеточной структуры кардиомиоцитов методом иммунофлуоресцентного анализа с помощью конфокального микроскопа. Помимо условий анизотропии для формирующихся кардиослоев создавались условия матрикса различной жесткости, что может сказаться на проявлении гипертрофической кардиомиопатии. Для этого использовался полидиметилсилоксан в различных концентрациях полимера.

В работе была подобрана максимально приближенная по физиологическим характеристикам среда для развития и образования возбудимой ткани из кардиомиоцитов для возникновения критических случаев проведения волн возбуждения, которая подходит для тестирования вероятности ВСС. Система является пациент-специфичной, так как в ней могут тестироваться различные линии пациентов, с патологиями и без них. Данные тестирований условий для различных линий показали, что при сильной изначальной анизотропии матрикса формирование сердечных слоев сильно затруднено, но при изначальной изотропности подложки формирование функционального кардиослоя не происходило в принципе. В процессе работы также были определены значимые электрофизиологические характеристики кардиомиоцитов, полученных от пациентов с ГКМП. Для

кардиослоев с ГКМП характерна нестандартная электрофизиологическая активность и более интенсивная внутриклеточная кальциевая активность (рис. 2).

В перспективе данная работа с добавлением программного модуля виртуального миокарда (в виде компьютерного продукта) позволит модернизировать и усовершенствовать существующие методы прогнозирования жизнеугрожающих нарушений ритма, значительно снизить риски возникновения внезапной сердечной смерти у людей, находящихся на диспансерном наблюдении, и лиц с заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

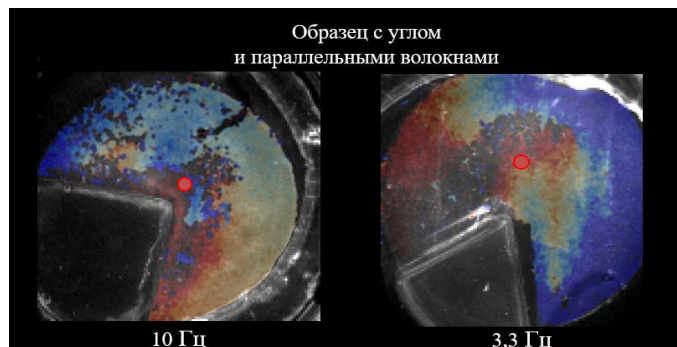


Рисунок 1. Пример активационных карт возникновения реентри на препятствии при различных частотах стимуляции для образцов с углом из мягкого полимера и направленными параллельно волокнами. Красным кругом обозначено предполагаемое ядро реентри.

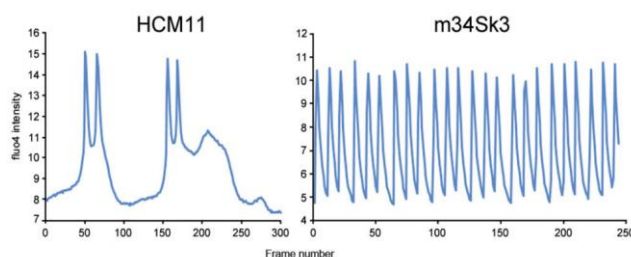


Рисунок 2. Записи флуоресценции с помощью кальций-зависимого красителя для кардиослоев с ГКМП (HCM11, 40-ой день дифференцировки) и кардиослоев от здорового донора (m34sk3, 40-ой день дифференцировки)

Литература

1. *Slotvitsky M. et al.* Arrhythmogenicity test based on a human-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocyte layer // *Toxicological Sciences*. – 2019. – Т. 168. – №. 1. – С. 70-77.
2. *Lian X. et al.* Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions // *Nature protocols*. – 2013. – Т. 8. – № 1. – С. 162.
3. *Burridge P.W. et al.* Chemically defined generation of human cardiomyocytes // *Nature methods*. – 2014. – Т. 11. – № 8. – С. 855

УДК 577.352.26

Исследование фотодинамической активности серии окта-катионных комплексов фталоцианина с ионом магния или цинка на модельной липидной мембране

Д.Д. Зыкова^{1,2}, А.Н. Константинова², В.С. Соколов²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт физической химии и электрохимии имени А. Н. Фрумкина РАН

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) показал свою эффективность для борьбы с раковыми заболеваниями и как способ дезактивации патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам. Он основан на использовании фотосенсибилизаторов (ФС), которые окисляют жизненно важные молекулы в клетке активными формами кислорода, образующимися за счет энергии поглощенного света. С целью повышения эффективности ФДТ синтезируют новые ФС, в связи с чем возникает необходимость в развитии методов их тестирования в системе, близкой по структуре к мембране клетки. В настоящей работе такие исследования проводились на бислойной липидной мембране (БЛМ), являющейся моделью клеточной мембраны.

Адсорбцию и фотодинамическую активность новых синтезированных в ИФХЭ РАН ФС – комплексов фталоцианина (Фц) с ионом магния (8bMgPc) или цинка (8bZnPc) изучали, измеряя скачок потенциала на границе БЛМ с раствором. Данные соединения имеют на периферии 8 положительно заряженных групп и различаются только ионом металла в центре макрокольца. Изменения граничного потенциала $\Delta\phi_b$ измеряли двумя методами: разработанным в лаборатории методом компенсации внутримембранного поля (IFC) и по изменению проводимости БЛМ, индуцированной нонактином. Изменения ζ -потенциала липосом измеряли методом динамического светорассеяния [2].

Полученные методом IFC значения $\Delta\phi_b$ являются положительными и увеличиваются при увеличении концентрации Фц, что говорит о связывании с БЛМ положительно заряженных молекул наших Фц. На рисунке 1А показано, что значения $\Delta\phi_b$, полученные для 8bMgPc и 8bZnPc, близки, что говорит о незначительном влиянии природы иона металла в центре молекулы на их адсорбционные свойства. Значения $\Delta\phi_b$, измеренные при адсорбции 8bMgPc методом IFC, совпали со значениями $\Delta\phi_b$, которые определялись по изменению проводимости БЛМ, индуцированной нонактином. Это свидетельствует, что молекулы 8bMgPc не проникают через БЛМ.

Наклоны зависимости $\Delta\phi_b$ от логарифма концентрации Фц в растворе значительно превышали величину, предсказываемую на основе предположения, что заряды адсорбируемых соединений лежат на поверхности мембраны, а скачок потенциала удовлетворяет теории Гуи-Чепмена [3]. Полученные значения ζ -потенциалов оказались меньше соответствующих значений граничного потенциала, полученного методом IFC. Такое различие между значениями ζ -потенциалов и $\Delta\phi_b$ означает, что адсорбированные соединения вызывают изменение потенциала глубже поверхности мембраны, и соответственно заряженные группы 8bMgPc и 8bZnPc при адсорбции погружаются в гидрофобную область БЛМ.

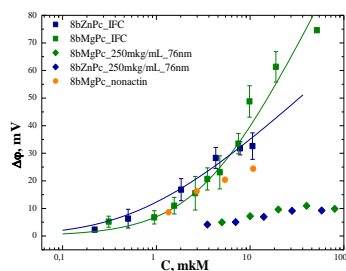
При связывании с мембраной комплекса фталоцианина с ионом цинка 8bZnPc обнаружено увеличение проводимости мембраны, которая начинала расти в момент добавления в водный раствор ячейки аликвоты концентрированного раствора Фц, но со временем спадала до исходной величины. Это может объясняться перестройкой липидов, окружающих молекулы 8bZnPc в мембране, в результате которой возникают проводящие дефекты или водные поры [4]. Добавление к DPhPC холестерина (30 мольных %) не влияло на возникновение проводимости, но ускорило ее спад, что видно на рисунке 1Б. Возрастание проводимости при адсорбции 8bMgPc не наблюдалось, что свидетельствует о роли существенной роли в образовании водных пор взаимодействия между ионом цинка в молекуле 8bZnPc и фосфолипидами в БЛМ.

Фотодинамическая активность исследуемых фталоцианинов определялась по скорости R разрушения молекулы-мишени синглетного кислорода di-4-ANEPPS при освещении БЛМ. Разрушение молекул di-4-ANEPPS регистрировали по исчезновению дипольного скачка потенциала, создаваемого ими на поверхности БЛМ. Молекулы мишени и Фц адсорбировали по разные стороны мембраны, чтобы исключить их взаимодействие в растворе, и разрушение di-4-ANEPPS происходило из-за их окисления синглетным кислородом, проникающим через БЛМ. По кинетике изменения $\Delta\phi_b$ при освещении БЛМ и его восстановления в темноте определяли скорость R разрушения di-4-ANEPPS, пропорциональную стационарной концентрации синглетного кислорода в мембране. Зависимости R от концентрации 8bMgPc и 8bZnPc в растворе были близки друг к другу, что видно на рисунке 1В. В диапазоне концентраций 10^{-8} - 10^{-6} М параметр R линейно возрастает для исследуемых Фц, а при концентрации выше 10^{-5} М перестает расти и выходит на плато, что можно объяснить тушением синглетного кислорода молекулами фталоцианина в мембране [5].

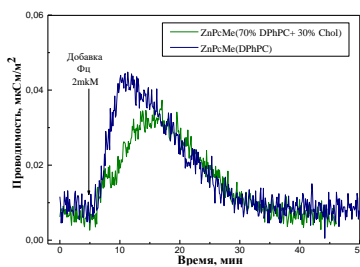
Из проведенных исследований можно заключить, что природа иона металла в центре молекулы изученных комплексов фталоцианина мало влияет на их адсорбционные и фотодинамические свойства, но сказывается на структурных перестройках липидного бислоя, которые вызваны встраиванием молекул Фц в БЛМ. Заряженные группы исследуемых Фц погружаются в гидрофобную область БЛМ, и адсорбция молекул 8bMgPc происходит без их проникновения через мембрану. Скорость разрушения молекул di-4-ANEPPS, которая характеризует фотодинамическую эффективность фталоцианинов, растет с увеличением их концентрации в растворе, и перестает расти при высоких концентрациях из-за тушения синглетного кислорода молекулами фталоцианина в мембране.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда РФ, проект № 19-13-00410.

А



Б



В

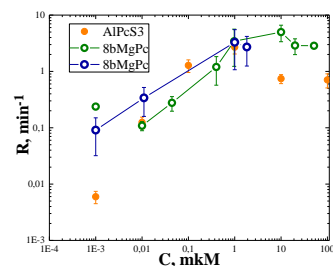


Рисунок 1. А) Концентрационные зависимости изменения $\Delta\phi$ и ζ -потенциала при адсорбции 8bMgPc и 8bZnPc на БЛМ; Б) Зависимость проводимости мембраны в присутствии 8bZnPc: DPhPC (70%) + chol (30%); В) Зависимость скорости повреждения мишени di-4-ANEPPS от концентрации AIPcS3 и 8bMgPc и 8bZnPc в растворе в trans- конфигурации

Литература

1. *Bunin D A., et al.* Robust Route toward Cationic Phthalocyanines through Reductive Amination // *Dyes and Pigments* vol. 207, no. August, Elsevier Ltd, 2022, p. 110768.
2. *Sokolov V.S., Kuzmin V.G.* Measurement of the Difference in the Surface Potentials on Bilayer Membranes from the Second Harmonic Og the Capacitance Current // *Biophysics*, vol. 25, 1980, pp. 171–77.
3. *McLaughlin S.* The electrostatic properties of membranes // *Annu Rev Biophys, Biophys Chem.* 1989;18:113-36.
4. *Orekhov P.S., et al.* Molecular Mechanism of Uptake of Cationic Photoantimicrobial Phthalocyanine across Bacterial Membranes Revealed by Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem B.* 2018 Apr 12;122(14):3711-3722.
5. *Krasnovsky A.A., et al* Quenching of singlet molecular oxygen by phthalocyanines and naphthalocyanines // *Photochemistry and Photobiology*, 2008, 55(5), 691–696.

УДК 577.352.5

Сравнение восстановления работы ионных каналов в кардиомиоцитах человека после операций с кардиоплегическими растворами Нормакори Кустодиол

А.В. Березовский¹, С.Г. Коваленко^{1,2}, С.Р. Фролова^{1,2}, К.И. Агладзе^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского

Известно, что при операциях на открытом сердце использование кардиоплегического раствора в сочетании с гипотермией позволяет избежать глобальной ишемии сердца [1]. Однако, у пациентов нередко наблюдаются осложнения в виде послеоперационных аритмий. Одним из возможных послеоперационных аритмогенных факторов является действие кардиоплегического раствора на потенциалзависимые ионные каналы.

Исследование направлено на установление закономерностей возникновения аритмий, возникающих после операций по коронарному шунтированию при кардиopleгии Кустодиолом и Нормакором, на уровне потенциалзависимых ионных каналов, ответственных за формирование потенциала действия.

Сравнивались электрофизиологические свойства быстрых натриевых каналов, кальциевых каналов L-типа и медленных калиевых каналов до и после операции по коронарному шунтированию. Цель исследования – сравнить электрофизиологические свойства ионных каналов кардиомиоцитов, полученных из биоптата предсердия сердца человека, после восстановления сердечного ритма в результате отмыва сердца от кардиоплегических растворов Нормакор и Кустодиол.

Первичные кардиомиоциты человека выделялись из биоптата правого предсердия с использованием запатентованного протокола выделения человеческих кардиомиоцитов в нашей лаборатории (патент RU 2749986). Средний возраст пациентов составил 63 года. Все эксперименты проводились при физиологической температуре 37°C методом пэтч-кламп. Были изучены: ток быстрых натриевых каналов (INav), кальциевых каналов L-типа (ICa, L) и медленных калиевых каналов (IKs).

Мы сравнили два кардиоплегических раствора Кустодиол и Нормакор (рис. 1) с точки зрения их влияния на восстановление ионных каналов кардиомиоцитов предсердий человека (I_{Nav} , I_{Ca} , I_L , I_{Ks}) после операции. Контрольная группа состояла из кардиомиоцитов биоптата, иссеченного "до операции", а эффект кардиоплегического раствора наблюдался в биоптатах "после операции". Было обнаружено, что после отмыва Кустодиола быстрые натриевые каналы восстанавливаются практически в свои контрольные значения, но I_{Ks} сохраняют инактивированное состояние на 30%. Для I_{Ca} , I_L наблюдается уменьшение амплитуды в одинаковой степени как после операции с Нормакором, так и с Кустодиолом (рис. 2). После отмыва Нормакора Na -каналы восстанавливаются хуже, в то время как Ks -каналы после Нормакора восстанавливаются полностью (рис. 3).

Кардиоплегический раствор гистидин-триптофан-кетоглутарата (НТК) или Кустодиол по существу представляет собой кристаллоидную кардиopleгию "внутриклеточного типа", сформулированную в виде раствора с низким содержанием натрия и кальция, который вызывает гиперполяризацию мембраны кардиомиоцитов, обеспечивая остановку сердца в диастолу. Нормакор - первый российский препарат для проведения операций на открытом сердце в условиях нормотермии. Нормакор продлевает устойчивость миокарда к гипоксии за счет блокады запуска энергозатратных процессов, снижая энергетические потребности миокарда до минимального уровня. Обеспечивает эффективную защиту миокарда от ишемических и реперфузионных повреждений в условиях нормотермии или умеренной гипотермии и не ограничивает продолжительность проведения операций. По сравнению с холодной кристаллоидной кардиopleгией, кровяная кардиopleгия при физиологической температуре требует более короткого интервала введения до остановки сердца.

Известно, что послеоперационные аритмии в большинстве случаев восстанавливаются в течении двух недель и скорее всего, мы полагаем, что это происходит из-за подавления калиевых токов. Следующим этапом исследования будет показать, восстановление I_{Ks} на следующий день после выделения изолированных кардиомиоцитов биоптата сердца человека, посаженных на покровные стекла. Исследования продолжаются...

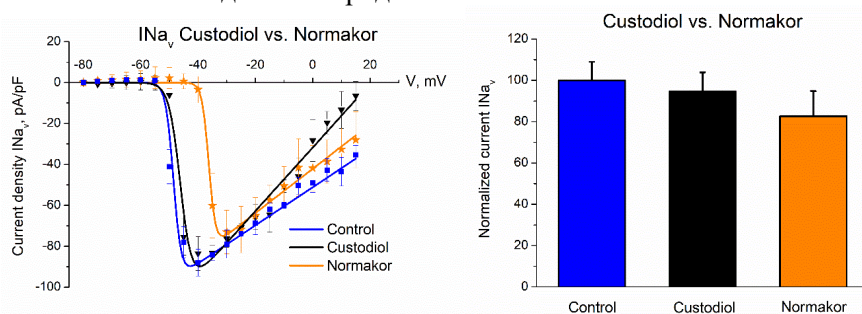


Рисунок 1. А. Вольтамперная кривая быстрых натриевых каналов I_{Nav} кардиомиоцитов предсердий человека в контроле (синяя кривая, $n=5$), после отмыва от Кустодиола (черная кривая, $n=5$) и после отмыва от Нормакора (оранжевая кривая, $n=5$); Б. Сравнение амплитуд I_{Nav} в контроле, после Кустодиола и Нормакора.

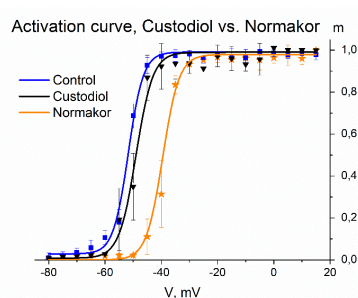


Рисунок 2. Кривые активации m I_{Nav} в контроле (синяя кривая, $n=5$), после отмыва от Кустодиола (черная кривая, $n=5$) и после отмыва от Нормакора (оранжевая кривая, $n=5$).

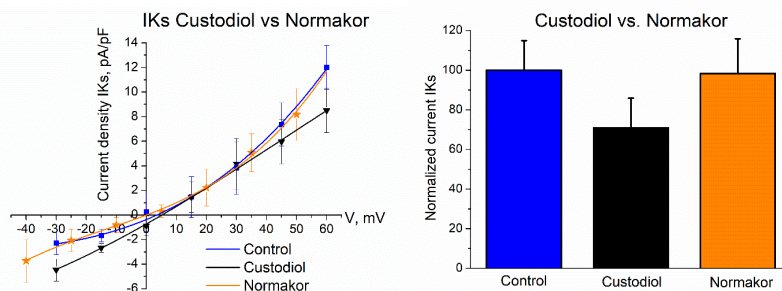


Рисунок 9. А. Вольтамперная кривая медленных калиевых каналов I_{Ks} кардиомиоцитов предсердий человека в контроле (синяя кривая, $n=4$), после отмыва от Кустодиола (черная кривая, $n=4$) и после отмыва от Нормакора (оранжевая кривая, $n=4$); Б. Сравнение амплитуд I_{Ks} в контроле, после Кустодиола и Нормакора.

Литература

1. *Carmo H.P. et al. Lidocaine and pinacidil added to blood versus crystalloid cardioplegic solutions: study in isolated hearts. Brazilian journal of cardiovascular surgery. – 2018. – Т. 33. – №. 3. – С. 211-216.*

УДК 577.359

Разработка технологии для трансплантации сердечных клеток на основе полимерных микроносителей

Е.Г. Рыбкина¹, А.А. Аитова¹, С.А. Щербина¹, М.М. Слотвицкий¹, В.А. Цвеляя¹, К.И. Агладзе¹

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Ключевые слова: сердечно-сосудистая система; культивирование клеток; микроносители; оптическое картирование; трансплантация; приживление; электроспиннинг; электрофизиологическая связь

Локальные повреждения миокарда множатся в течение жизни, приводят к ремоделированию сердечной ткани и становятся субстратом для возникновения фатальных сердечных аритмий. Хотя генерация сердечных клеток *ex vivo* становится возможной, конкретные подходы к заместительной клеточной терапии при таких повреждениях и дефектах миокарда остаются неясными. Адгезивные клетки миоцитов, с одной стороны, должны быть жизнеспособными и сопрягаться с электромеханическим синцитием реципиентной ткани, что недостижимо без внешнего скаффолда-субстрата [1,2,3]. С другой стороны, внешний скаффолд может препятствовать доставке клеток, например, затруднять интрамиокардиальное введение.

В данной работе описаны молекулярные транспортные средства, которые разрешают это противоречие. Они сочетают в себе внутренний (а не внешний) полимерный каркас, который поглощается клеткой и обеспечивает ориентацию сократительного цитоскелета. Он также обеспечивает покрытие комплексами RGDS, которые инициируют процесс адгезии трансплантата в ткани реципиента и могут нести флуоресцентные маркеры для внешнего контроля положения неинвазивной клетки.

Эксперименты по трансплантации клеток проводились *in vivo*. Используемые флуоресцентные метки позволили доказать быстрое (<1 часа) установление электромеханического контакта между трансплантатом и сердцем реципиента с помощью оптического картирования (на сердце крысы с перфузией Лангендорфа). Таким образом, неинвазивная адресная доставка клеток с использованием предложенных молекулярных транспортных средств будет способствовать скорейшему восстановлению локальных повреждений рабочего миокарда, обеспечивая максимальный оптический контроль операции и минимизируя возможные аритмии.

Литература

1. *Balashov V., Efimov A., Agapova O., Pogorelov A., Agapov I., Agladze K. High resolution 3D microscopy study of cardiomyocytes on polymer scaffold nanofibers reveals formation of unusual sheathed structure. Acta Biomater. 2018, 68, 214–222.*

2. *Kadota S., Shiba Y. Pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte transplantation for heart disease treatment. Curr. Cardiol. Rep. 2019, 21, 73.*

3. *Slotvitsky M., Berezhnoy A., Scherbina S., Rimskaya B., Tsvelaya V., Balashov V., Efimov A.E., Agapov I., Agladze K. Polymer Kernels as Compact Carriers for Suspended Cardiomyocytes. Micromachines 2023, 14, 51.*

Development of an innovative sweetener and testing of its geroprotective activity on a model system of nematodes *C. elegans**M.V. Budaeva*¹, *D.M. Tarasova*¹, *E.I. Marusich*¹, *A.V. Belova*¹¹Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)

We developed a new functional sweetener containing sweet amino acids and prebiotics (the full composition is not disclosed due to the trade secret). The analysis of literature sources on existing sweeteners demonstrates the advantage of our proposed new sweetener over existing sugar substitute analogues. The nematodes *C. elegans* animal model was chosen to confirm the new sweetener ingredients biosafety, geroprotective capacity including the sweetener's effect on the lifespan of nematodes, their resistance to oxidative stress and effect on lipid droplet accumulation in the body of nematodes. The *C. elegans* nematode's model system were chosen as the first stage of the properties of the sweetener study, including the effect of the sweetener on the lifespan of nematodes, their resistance to oxidative stress and the accumulation of lipid droplets in organisms.

The purpose of the study is to demonstrate the absence of toxicity of the new sugar substitute analogues on the nematodes lifespan, compared to the nematodes population under the influence of conventional sweeteners. It was also important to compare the activity of the new sweetener with sugar and the most popular analogue – stevia. Moreover, we used metformin (a well-known geroprotector and antidiabetic drug) as a positive control.

For the experiments of lifespan and resistance to the oxidative stress assessment the tested compounds as new sweetener, stevia and sucrose were taken at concentrations of 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, and 10.0 mg/ml. The positive control metformin was used in concentrations 0.1 μM, 1.0 μM and 10 μM. The intact population of nematodes (without the edited tested compounds) served as a negative control. The lifespan of the nematodes was monitored by counting the number of alive and dead species every three days using an AXIO Observer Z1 microscope. The assessment of influence of all chemicals to the oxidative stress resistance was performed in the presence of hydrogen peroxide at 10 mM concentration (after 7 and again after 11 days after incubation with added test compounds). Monitoring of the number of dead and alive species was carried out 2-3 times per week. The assessment of the lipid droplets accumulation in *C. elegans* body was done as following: the new sweetener, stevia, sucrose were tested at concentrations of 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, and metformin as a positive control at concentrations 0.1 μM, 1.0 μM and 10 μM. The intact population of nematodes (without the addition of test compounds) served as a negative control.

The results of the effect of sugar and sweeteners on the lifespan of nematodes showed an increase of the nematodes lifespan under the influence of a new sweetener at all concentrations, except 10 mg/ml, compared to the control. At the same time, under the influence of sucrose a significant decrease in life expectancy was observed under the influence of sucrose. Thus, on the 26th day of the experiment in the concentration of 0.1 mg/ml of added substances percentage of alive species consuming sucrose comprised 37.19%, compared to 65.89% survived nematodes, which consumed the new sweetener. This result demonstrated the 28.7% increase of lifespan efficacy under the influence of our new developed sweetener, compared with conventional sugar consumption (pic. 1). To identify the substance with the most pronounced geroprotective properties, a comparative analysis was carried out for substances at the concentration of 0.1 mg/ml and control. On the 18th day of the experiment, the greatest increase in life expectancy was observed: by 16.76%, in the presence of a sweetener at a concentration of 0.1 mg/ml relative to the control and the well-known geroprotector Metformin at a concentration of 10 μM (fig.1). The study of the effect of sugar and stevia on the oxidative stress resistance of nematodes of all substances demonstrated that the only a new sweetener at a concentration of 1 mg/ml contributed to an increase in the lifespan of nematodes under oxidative stress. This confirms the geroprotective activity of this composition and shows its advantage over sugar and stevia.

In conclusion, the conducted experiments showed the biosafety of the new developed sweetener, its geroprotective activity, which allows us to conclude that this innovative sweetener can be potentially used in the food industry and open the avenue in taking steps to commercialize the developed sweetener.

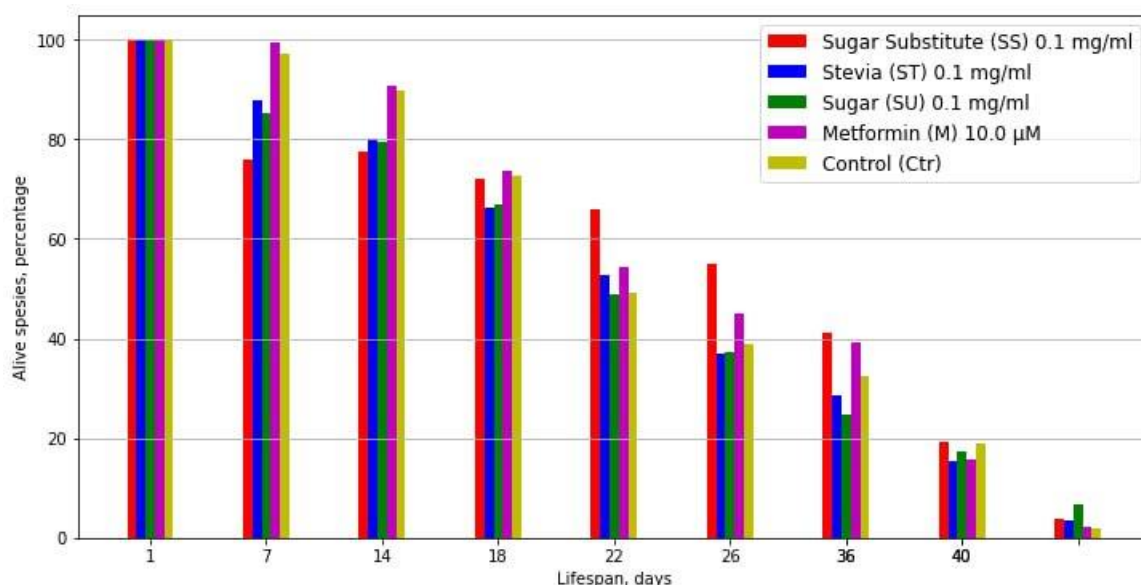


Figure 1. The survival of nematodes under the influence of different substances at a concentration of 0.1 mg/ml and metformin at a concentration 10 µM, compared to the control.

References

1. Zheng J. *et al.* Effects of three intense sweeteners on fat storage in the *C. elegans* model. *Chem Biol Interact.* 2014 May 25;215:1-6. doi: 10.1016/j.cbi.2014.02.016. Epub 2014 Mar 13. PMID: 24632416.
2. Zhang M. *et al.* Evaluation of the effects of three sulfa sweeteners on the lifespan and intestinal fat deposition in *C. elegans*. *Food Res Int.* 2019 Aug; 122:66-76. doi: 10.1016/j.foodres.2019.03.028. Epub 2019 Mar 13. PMID: 31229125.

УДК 612.822.3

Паттерны нейронной активности субталамического ядра у пациентов с асимметричным проявлением болезни Паркинсона

*Ф.Н. Павловский*¹, *А.А. Гамалея*², *А.С. Седов*¹

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН

² Центр нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко

Болезнь Паркинсона (БП) – распространённое заболевание, поиску биологических маркёров которого посвящено большое количество работ. Существуют различные модели, предлагающие считать таковыми различные паттерны активности субталамического ядра (СТЯ), такие как общая гиперактивность его нейронов и увеличение мощности осцилляций в бета-диапазоне (13-30 Гц). Ни один из описанных на сегодняшний день маркёров, однако, не является однозначным. Существенным ограничением исследований на людях в этой области является отсутствие надёжной контрольной группы.

В данной работе мы исследовали особенности активности субталамических ядер, принадлежащих разным полушариям одного и того же человека. Мы анализировали данные, полученные на пациентах с асимметричным проявлением БП, т.е. с неодинаковой выраженностью брадикинезии, ригидности и тремора вдоль вертикальной оси тела. Степень выраженности симптомов оценивал невролог по шкале UPDRS. Если разница между сторонами тела по каждому симптому превышала 25%, такого пациента включали в исследование. Таким образом, одно СТЯ у каждого пациента соответствовало стороне с более выраженными симптомами (“аффертное” ядро), а второе (“неаффертное” ядро) выступало условным контролем.

В исследование были включены 10 пациентов, которым проводили микроэлектродную регистрацию активности одиночных нейронов и регистрацию локальных потенциалов поля (LFP) СТЯ во время операций по вживлению электродов для глубокой стимуляции мозга (deep brain stimulation, DBS).

Для анализа зарегистрированные нейроны были поделены на три группы в соответствии с типом их активности (рис.1) – на тонические, пачечные и паузные клетки - с помощью метода иерархической кластеризации на основе алгоритма Уорда [1]. Мы обнаружили, что пачечные нейроны в “аффертном” СТЯ характеризуются повышенной частотой пауз и сниженным межпаузным

интервалом ($p < 0,05$ по U-тесту Манна-Уитни). В "аффектном" СТЯ также выше доля паузных нейронов, но различий в их активности или в активности тонических обнаружено нейронов не было. Мы также не обнаружили предсказанную классической моделью работы базальных ганглиев [2] гиперактивность нейронов «аффектного» СТЯ. Мы предполагаем, что часть нейронов СТЯ (пачечные в нашей выборке) меняют паттерн своей активности в сторону более ритмической активности (паузные в нашей выборке), что подтверждает гипотезу о связи ритмической активности нейронов СТЯ с болезнью Паркинсона [3].

LFP были проанализированы путем оценки синхронности осцилляций (o-scores) в нескольких спектральных диапазонах после вычитания аperiodической компоненты сигнала ($1/f$). Мы показали, что мощность осцилляций в высокочастотном бета (20-30 Гц) диапазоне, вопреки ожиданиям, была значимо ниже в "аффектном" ядре, а различий в низкочастотном бета-диапазоне (13-20 Гц) обнаружено не было. Наклон $1/f$ аperiodической компоненты, который связывают с соотношением возбуждающих и ингибирующих влияний на рассматриваемую структуру [4], значимо выше в "аффектном" СТЯ. Это может свидетельствовать о том, что нейроны СТЯ при болезни Паркинсона испытывают большее по силе тормозящее воздействие, чем в норме.

Наши результаты позволяют предположить, что более ритмичный характер активности пачечных нейронов СТЯ может рассматриваться как маркёр БП. Увеличение наклона аperiodической компоненты также могут быть связаны с этим расстройством, в то время как значимость колебаний в низко- и высоко-бета-диапазонах требует дальнейшего изучения.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-15-00344.

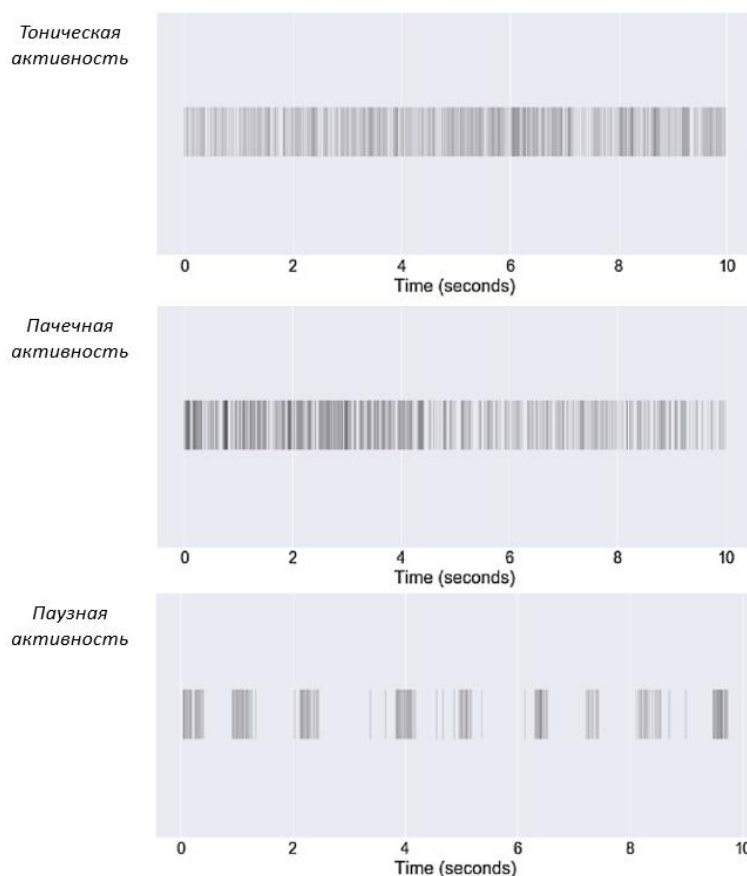


Рисунок 1. Примеры тонической, пачечной и паузной активности нейронов (по [5], с изменениями).

Литература

1. Ward Jr J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function // J. Am. Stat. Assoc. 1963. V. 58. № 301. P.236-244.
2. DeLong M.R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin // Trends Neurosci. 1990. V. 13. № 7. P. 281-285.
3. Scherer M., Steiner L.A., Kalia S.K., et al. Single-neuron bursts encode pathological oscillations in subcortical nuclei of patients with Parkinson's disease and essential tremor // Proc Natl Acad Sci USA. 2022. V.119. № 35.

4. Gao R., Peterson E.J., Voytek B. Inferring synaptic excitation/inhibition balance from field potentials // *NeuroImage*. 2017. V. 158. P 70–78.

5. Myrov V., Sedov A., Belova E. Neural activity clusterization for estimation of firing pattern // *J Neurosci Methods*. 2019. V. 311 P. 164-169.

УДК 57.352

Атомно-силовая микроскопия белка Е коронавируса SARS-CoV-2

П.К. Гифер^{1,2}, О.В. Батищев^{1,2}

¹Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Коронавирусы являются оболочечными вирусами, липидный бислой которых включает три белка: поверхностный белок S, мембранный белок М и белок оболочки Е [1]. В то время как некоторые из коронавиральных белков хорошо охарактеризованы, другие остаются недостаточно изученными. Белок Е коронавирусов представляет собой небольшой интегральный мембранный белок из 76 аминокислот с одним предполагаемым трансмембранным α -спиральным гидрофобным доменом длиной 20–30 аминокислот, окруженным коротким N-концом (<10 аминокислоты) и более длинный С-концевой хвост [2]. Белок Е коронавируса SARS-CoV-2 обладает высоким уровнем гомологии с SARS-CoV, а также схож с ним по структуре и функциям. Учитывая эти факты, можно предположить, что свойства этих вирусов сопоставимы [3].

Белок Е способствует упаковке и размножению вируса, а удаление этого белка ослабляет или даже устраняет инфекционность. Еще одной предполагаемой ролью данного белка является стимуляция клеточного апоптоза [2]. Также было обнаружено, что белок Е олигомеризуется, образуя пентамерную структуру, которая отображает активность ионного канала [3].

Полноценное понимание роли Е белка в жизненном цикле вируса требует знания структуры и физико-химических свойств данного белка. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет визуализировать динамику адсорбции, диффузии и взаимодействия различных биомолекул в их естественной жидкой среде на молекулярном уровне в режиме реального времени [4]. В данной работе была исследована структура Е белка SARS-CoV-2 и его доменов методом АСМ высокого разрешения. Получена структура отдельных молекул белка и его олигомерных комплексов в липидном окружении, топограммы которых представлены на рисунке 1.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№22-13-00435).

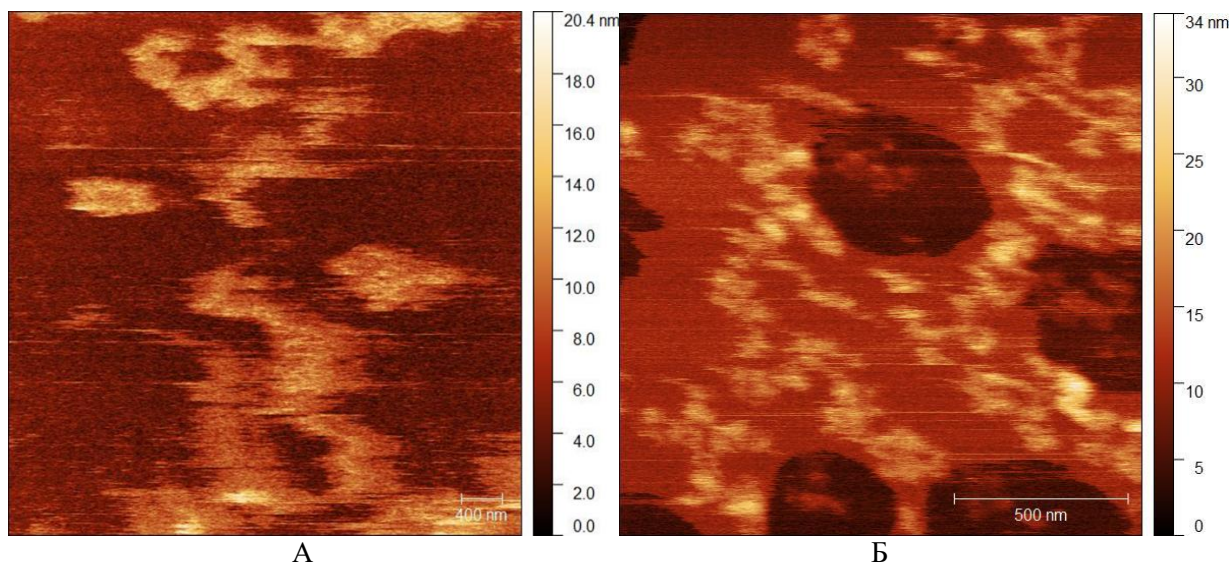


Рисунок 1. Топограммы АСМ раствора белка Е в концентрации 300 нМ, адсорбированного на поверхности свежесколотой слюды (А) и липидного бислоя (Б)

Литература

1. Sarkar M., Saha S., Zhang Y. Structural insight into the role of novel SARS-CoV-2 E protein: A potential target for vaccine development and other therapeutic strategies // *PLoS ONE*. 2020. V. 15. P. 1.

2. Cao Y. et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin and Inhibitors // Protein Sci. 2021. V. 30. P. 1114.

3. Kuzmin A. et al]. Structure and dynamics of the SARS-CoV-2 envelope protein monomer // Proteins. 2022. V. 90. P. 1102.

4. Garcia-Manyes S., Domènech Ò., Sanz F., Montero M. T., Hernandez-Borrell J. Atomic force microscopy and force spectroscopy study of Langmuir–Blodgett films formed by heteroacid phospholipids of biological interest // BBA Biomembr. 2007. V. 1768. P. 1190.

УДК 57.2788

Морфология клеточных субпопуляций рака молочной железы

К.В. Максимова, Е.Г. Контарева, М.В. Пустовалова, С.В. Леонов, Ю.Б. Мерхер

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Основной причиной смертности от рака являются метастазы. Точный и быстрый прогноз метастазирования опухоли важен для выбора схемы лечения и может оказать решающее влияние на выживаемость пациентов. Критически важным этапом в формировании метастазов является инвазия раковых клеток. В процессе инвазии метастатические клетки изменяют свою форму и оказывают воздействие на окружающую их среду. Клетки с высоким метастатическим потенциалом (МП) характеризуются более подвижным цитоскелетом и более мягкой внутриклеточной средой [1]. Ранее в нашей лаборатории была показана взаимосвязь между способностью к инвазии и интенсивностью инкапсуляции наночастиц [2]. В обоих процессах важную роль играет актиновый цитоскелет, который ответственен в том числе и за форму клеток [3]. Цель настоящего исследования состоит в количественном сравнении морфологических признаков клеточных субпопуляций в зависимости от степени инвазивности и температурных условий.

Исследование проводилось на клеточных линиях рака молочной железы (РМЖ) с высоким (MDA-MB-231) и низким (MCF-7) МП. Для разделения популяции клеток на субпопуляции инвазивных и неинвазивных клеток мы использовали камеры Бойдена, состоящие из двух вставленных друг в друга камер. Дно внутренней камеры (вставки) представляет собой полупроницаемую мембрану с порами 8 мкм, которая обеспечивает контакт между внутренней и наружной камерой, содержащей как правило более высокую концентрацию хемоаттрактанта, задающего направление миграции клеток. Для этого клетки были культивированы в стандартных условиях (37 °С, 5% CO₂) до 70–80 % конfluence, и подвержены клеточному голоданию на 24 часа с помощью клеточной среды, не содержащей фетальную бычью сыворотку. После этого 100 мкл клеток с концентрацией 10⁶ клеток/мл высаживали во вставки камер Бойдена (минимум 3 повтора при 3 биологически не зависимых экспериментах). Для создания хемоаттрактантного градиента во внешнюю камеру наливали среду с повышенным содержанием сыворотки (20%). После инкубации в течение 72 часов в стандартных условиях собирали отдельно клетки прошедшие и не прошедшие через мембраны. Клетки высаживали в 24-луночные планшеты в концентрации 100 000 кл/мл. После 24 часов инкубации в стандартных условиях проводили визуализацию. Также для клеточной линии MDA-MB-231 был поставлен аналогичный эксперимент, но после инкубации при 37 °С клетки выдерживались 1 час при 4 °С. Визуализация производилась с помощью полу-автоматизированной системы EVOS M5000 на базе флуоресцентного микроскопа с широким полем зрения; изображения получали с 10 участков в каждой лунке. Цифровые изображения (рис. 1) обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ, и для каждой клетки изучались следующие морфологические параметры: площадь (A), периметр (P), закругленность (R), циркулярность (C), вытянутость (E), длины наибольшей (Max) и наименьшей (Min) сторон, соотношение сторон (AR). Длины, периметр и площадь замерялись в пикселях;

$$AR = \frac{Min}{Max} \quad R = \frac{1}{AR} \quad C = \frac{4 \cdot \pi \cdot A}{P^2} \quad E = \sqrt{1 - \left(\frac{Min}{Max}\right)^2}$$

Для оценки статистической разницы производился дисперсионный анализ (ANOVA). Расчеты проводились с помощью программ MS Excel и MedCalc.

Наши эксперименты показали, что клетки линии MDA-MB-231, не прошедшие через мембрану камер Бойдена (UP), имеют меньшие значения по параметрам площадь (p<0,006), периметр (p<0,007), чем клетки, прошедшие ее (DOWN). Неразделенные гетерогенные клетки (WILD) с высоким МП (MDA-MB-231) и низким МП (MCF7) различаются площадью (p<0.009), циркулярностью (p<0.001) и закругленностью (p<0.0001): для клеток с высоким МП эти значения

выше, а клетки с низким МП оказались более эллиптическими. Клетки этих линий из группы UP различались по площади ($p<0,003$), периметру ($p<0,012$), максимальной ($p<0,005$) и минимальной ($p<0,003$) длине клетки: по этим параметрам клетки MDA-MB-231 превышают клетки MCF7. Для клеток, прошедших через мембрану камеры Бойдена, статистически значимых различий выявлено не было (табл. 1).

Также мы исследовали морфологию клеток с высоким МП (MDA-MB-231) при температуре 37°C и 4°C. Наблюдались различия в закругленности ($p<0.001$) и вытянутости ($p<0.023$): при 37°C клетки более округлые, а при 4°C клетки более вытянутые и по форме ближе к эллипсу (рис. 2).

Мы обнаружили, что высокоинвазивные клетки имеют большую площадь, периметр и округлость по сравнению с низкоинвазивными клетками. Это коррелирует с теорией «мягкого» цитоскелета для клеток с высоким метастатическим потенциалом. Более того, клетки из разных клеточных линий, способные к миграции через поры субклеточного диаметра, морфологически не различимы, тогда как материнские клетки этих клеточных линий отличаются по некоторым морфологическим параметрам. Следовательно, с помощью камер Бойдена, из общей гетерогенной массы можно выделить клетки с определенными механобиологическими признаками (что подтверждается результатами интенсивности инкапсуляции). Также результаты температурно-зависимых морфологических измерений соответствуют полученными нами ранее результатам по инкапсуляции наночастиц: размеры клеток не различаются, однако при высокой температуре высокометастатичные клетки имеют более округлую форму, что позволяет им более эффективно изменять цитоскелет и способствует интенсивной инкапсуляции наночастиц. Данные результаты морфологических параметров подтверждают и обосновывают новый прогностический метод определения МП клеток РМЖ разработанный в нашей лаборатории на базе интенсивности инкапсуляции наночастиц [4].

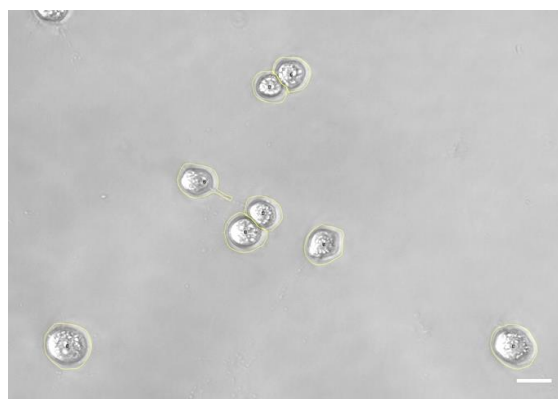


Рисунок 1. Высокоинвазивные клетки MDA-MB-231 при 37°C. Масштабная линейка в 20 μm . Желтым выделены границы клеток в программном

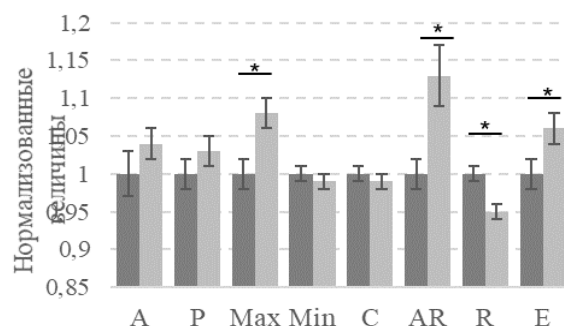


Рисунок 2. Морфологические параметры клеток MDA-MB-231 нормализованные к значениям при 37°C. Темно-серым отмечены значения при 37°C, светло-серым - при 4°C. Погрешностями отмечены стандартные ошибки. Отмечены статистически значимые параметры $p<0.05$.

Таблица 1. Значения параметров для высокоинвазивных (MDA-MB-231) и низкоинвазивных клеток (MCF7). А – площадь, Р – периметр, Max – длина наибольшей стороны, Min – длина наименьшей стороны, С – циркулярность, AR – соотношение сторон, R – закругленность, E – вытянутость. WILD – неразделенные клетки; UP – клетки, не прошедшие через мембрану камер Бойдена; DOWN – прошедшие мембрану

Параметр	MDA-MB-231 (WILD)	MCF7 (WILD)	MDA-MB-231 (UP)	MCF7 (UP)	MDA-MB-231 (DOWN)	MCF7 (DOWN)
A	16393	13933	15790	13032	19073	17774
P	470	468	456	419	514	486
Max	153	153	149	136	169	160
Min	136	115	133	120	142	140
C	0,93	0,85	0,94	0,93	0,9	0,94
AR	1,13	1,34	1,12	1,13	1,2	1,14
R	0,89	0,76	0,9	0,89	0,85	0,99
E	0,43	0,62	0,42	0,43	0,5	0,46

Литература

1. Gal N., Weihs D. Intracellular Mechanics and Activity of Breast Cancer Cells Correlate with Metastatic Potential. *Cell Biochemistry and Biophysics*, (2012). 63(3), 199–209. <https://doi.org/10.1007/s12013-012-9356-z>
2. Merkher Y., Kontareva E., Bogdan E., Achkasov K., Grolman J., Leonov S. Nanoparticle cellular endocytosis as potential prognostic biomarker for cancer progression. *FEBS Open Bio*, (2021). 11(S1), 429–430. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13205>
3. Alvarez-Elizondo M.B., Merkher Y., Shleifer G., Gashri C., Weihs D. Actin as a Target to Reduce Cell Invasiveness in Initial Stages of Metastasis. *Annals of Biomedical Engineering*, (2020). 49(5), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10439-020-02679-7>
4. Merkher Y., Kontareva E., Bogdan E., Achkasov K., Grolman J.M., Leonov S. Encapsulation and adhesion of nanoparticles as a potential biomarker for cancer cell metastatic propensity. (2022). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1802748/v1>

УДК 57 2788

Инкапсуляция наночастиц субпопуляциями клеточных линий рака молочной железы

Е.Г. Контарева, М.В. Пустовалова, С.В. Леонов, Ю.Б. Мерхер

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2020 году рак молочной железы (РМЖ) стал наиболее часто диагностируемым типом рака в мире – более 2,26 миллиона новых случаев и почти 685 000 смертей. РМЖ был наиболее частой причиной смерти от рака у женщин и пятой по распространенности причиной смерти от рака в целом. Сочетание раннего выявления опухоли и определение способности клеток опухоли к метастазированию увеличивают скорость получения прогноза, эффективность лечения и итоговых показателей выживаемости [1]. Ранее нами была показана связь интенсивности эндоцитоза с уровнем метастатического потенциала в популяции клеток РМЖ [2-4]. Мы изучали интенсивность инкапсуляции и адгезии карбоксилированных флуоресцентных полистироловых наночастиц размером 100 и 200 нм клетками РМЖ для оценки их метастатического потенциала (МП). В нашем исследовании использовали клеточные линии с заранее известным высоким метастатическим потенциалом (ВМП) – MDA-MB-231, низким метастатическим потенциалом (НМП) – MCF-7, и в качестве контроля использовали иммортализованную клеточную линию доброкачественной опухоли молочной железы MCF-10A. Мы обнаружили, что доброкачественные клетки за короткое время (1 ч) не способны интернализировать и адгезировать наночастицы, тогда как ВМП-клетки могут интернализировать в 2,18 и 1,4 раза больше наночастиц размером 100 и 200 нм соответственно, чем НМП-клетки. Одновременно ВМП-клетки интернализуют и прикрепляют в 2,22 раза и в 1,46 раза больше наночастиц размером 100 и 200 нм, соответственно, чем НМП-клетки, что делает добавление прилипших частиц незначительным для обнаружения различий между клетками с различным метастатическим потенциалом [2]. Целью данного исследования являлось проверка будет ли интенсивность инкапсуляции карбоксилированных флуоресцентных наночастиц клетками РМЖ коррелировать с величиной миграции клеток через пористые мембраны, используемой в качестве предиктора инвазивности опухолевых клеток.

Для разделения популяции клеток на субпопуляции инвазивных и неинвазивных клеток мы использовали камеры Бойдена, состоящие из двух вставленных друг в друга камер. Дно внутренней камеры (вставки) представляет собой полупроницаемую мембрану с порами 8 мкм, которая обеспечивает контакт между внутренней и наружной камерой, содержащей как правило более высокую концентрацию хемоаттрактанта, задающего направление миграции клеток. Поскольку высокоинвазивные клетки обладают способностью к деформации за счет мягкости и пластичности цитоскелета, то клетки, прошедшие через поры, будут обладать высокой склонностью к инвазии и миграции – чертами агрессивных раковых клеток [5]. Две описанные выше клеточные линии (MDA-MB-231 и MCF-7), были культивированы в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) до 70-80% конfluence, и подвержены клеточному голоданию на 24 часа с помощью клеточной среды не содержащей фетальную бычью сыворотку (FBS). После этого 100 мкл клеток с концентрацией 10⁶ клеток/мл высаживали во вставки камер Бойдена (минимум 3 повтора при 3 биологически не зависимых экспериментах). Для создания хемоаттрактантного градиента во внешнюю камеру наливали среду с повышенным содержанием сыворотки (20% FBS). Через 72 часа были отдельно собраны и подсчитаны количества клеток в верхней и в нижней камере, что позволило рассчитать процент мигрировавших субпопуляций клеток (рис. 1). После этого проводили уже описанные нами

ранее эксперименты по количественному определению инкапсуляции и инкапсуляции и адгезии [2] отдельно для выделенных субпопуляций каждой из клеточных линий.

Миграционный анализ с камерами Бойдена подтвердил МП описанных выше клеточных популяций (популяция клеток с ВМП имеет $32,1 \pm 4,2\%$ процента проникших через мембрану (инвазивных) клеток, тогда как в популяции клеток с НМП присутствует только $2,2 \pm 1,4\%$ инвазивных клеток). В обеих клеточных линиях интенсивность инкапсуляции карбоксилированных наночастиц значительно больше в субпопуляции мигрировавших (то есть более инвазивных) клеток (рис. 2). Такая же тенденция к большей интенсивности инкапсуляции и адгезии наночастиц отмечается для обеих клеточных линий ВМП и НМП (рис. 3), что подкрепляет нашу идею о связи интенсивности эндоцитоза и МП в клетках РМЖ. В соответствии с изначально определенным МП, наблюдается тенденция к большей интенсивности инкапсуляции, а также инкапсуляции и адгезии в соответствующих мигрировавших и немигрировавших субпопуляциях клеток с ВМП. Было обнаружено, что способность к инкапсуляции и инкапсуляции и адгезии НМП клеток, мигрировавших через камеры Бойдена в 1.5-1.7 раз выше чем у не мигрировавших, тогда как у ВМП клеток только в 1.3-1.4 раза. Интересно что способность к инкапсуляции НМП клеток, мигрировавших через камеры Бойдена, статистически не отличима от способности к инкапсуляции ВМП клеток, не мигрировавших через камеры Бойдена (то же явление наблюдается и для инкапсуляции и адгезии вместе).

Таким образом, мы получили подтверждение связи инвазивности популяций клеток РМЖ с помощью камер Бойдена и интенсивности поглощения ими карбоксилированных наночастиц, но на проведение эксперимента по эндоцитозу требуется значительно меньше времени, что делает его быстрее, проще и дешевле, и, в конечном итоге, может привести к созданию нового эффективного и количественного метода прогнозирования МП в популяции биопсийного материала РМЖ и увеличить скорость получения корректного лечения и выживаемость пациентов.

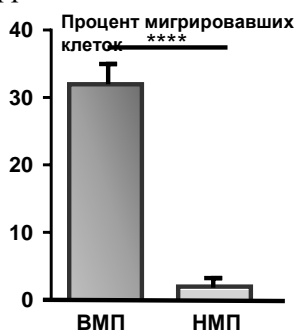


Рисунок 1. Процент мигрировавших через камеры Бойдена клеток с ВМП (MDA-MB-231) и НМП (MCF7). **** - $p < 0.0001$. Планками погрешностей отмечены стандартные ошибки.

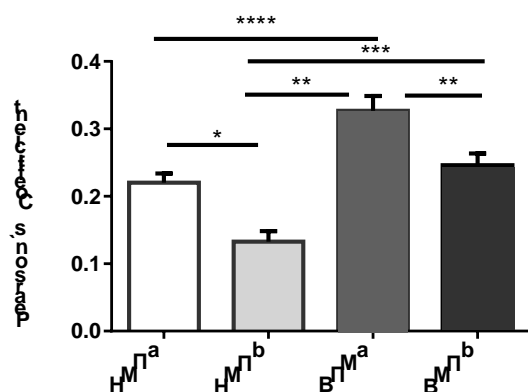


Рисунок 2. Средние значения коэффициента Пирсона для инкапсуляции карбоксилированных флуоресцентных наночастиц в субпопуляциях мигрировавших (а) и немигрировавших (б) клеток с ВМП MDA-MB-231 и НМП MCF-7. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.005$, *** - $p < 0.001$, **** - $p < 0.0001$. Планками погрешностей отмечены стандартные ошибки.

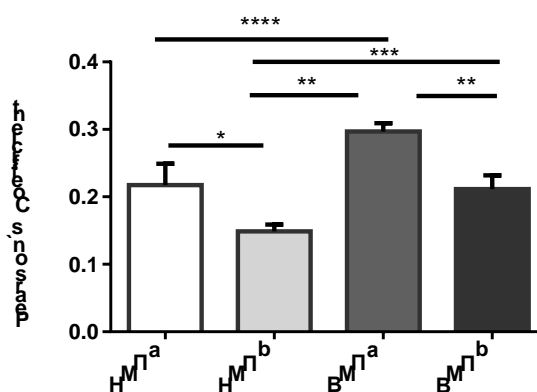


Рисунок 3. Средние значения коэффициента Пирсона для инкапсуляции и адгезии карбоксилированных флуоресцентных наночастиц в субпопуляциях мигрировавших (а) и немигрировавших (б) клеток с ВМП MDA-MB-231 и НМП MCF-7. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.005$, *** - $p < 0.001$, **** - $p < 0.0001$. Планками погрешностей отмечены стандартные ошибки.

Литература

1. *Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, (2021) 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. *Merkher Y., Kontareva E., Bogdan E., Achkasov K., Grolman J., Leonov S.* Nanoparticle cellular endocytosis as potential prognostic biomarker for cancer progression. *FEBS Open Bio*, (2021). 11(S1), 429–430. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13205>
3. *Merkher Y., Kontareva E., Bogdan E., Achkasov K., Grolman J.M., Leonov S.* Encapsulation and adhesion of nanoparticles as a potential biomarker for cancer cell metastatic propensity. (2022). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1802748/v1>
4. *Merkher Y., Kontareva E., Melekhova A., Leonov S.* (2021). Abstract PO-042: Nanoparticles imaging for cancer metastasis diagnosis. *Clinical Cancer Research*, (2021). 27 (5 Supplement), PO-042. <https://doi.org/10.1158/1557-3265.ADI21-PO-042>
5. *Merkher Y., Horesh Y., Abramov Z., Shleifer G., Ben-Ishay O., Kluger Y., Weihs D.* Rapid Cancer Diagnosis and Early Prognosis of Metastatic Risk Based on Mechanical Invasiveness of Sampled Cells. *Annals of Biomedical Engineering*, (2020). 48(12), 2846–2858. <https://doi.org/10.1007/s10439-020-02547-4>

УДК 620.3

Изучение растворимости наночастиц пористого кремния, покрытых полиэтиленгликолем, в модельных жидкостях

М.А. Годько, П.П. Путинцев, Д.А. Назаровская

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КР) является информативной экспериментальной методикой исследования свойств как твердотельных, так и биологических объектов. В настоящей работе методом спектроскопии КР изучены процессы растворения нанокристаллов кремния (нк-Si) в пористых наночастицах, без покрытия, и покрытых полиэтиленгликолем (ПЭГ), при их инкубации в фосфатном солевом буфере (PBS) и дистиллированной воде при температуре 37°C.

Пористые наночастицы кремния (КНЧ) имеют уникальные физико-химические и биологические свойства, и состоят из пересекающихся кремниевых нанокристаллов и пор [1]. В работе [2] показаны свойства низкой токсичности КНЧ при инкубации с клетками HeLa в течение 48 часов *in vitro*, а также высокой биосовместимости при введении наночастиц с концентрацией 20 мг/кг в кровотоки мышей. Продуктом разложения КНЧ в организме является ортокремниевая кислота. Она безопасна для человека и эффективно выводится почками. Таким образом, КНЧ могут быть использованы для доставки противоопухолевых лекарственных средств в организм человека.

КНЧ получают методом электрохимического травления пластин кристаллического кремния (с-Si), с последующим измельчением в планетарной шаровой мельнице [3]. Покрытие полиэтиленгликолем (ПЭГ) дает возможность наночастицам дольше циркулировать по кровеносному руслу организма [4]. Таким образом, увеличивается вероятность накопления наночастиц в нужной области организма. КР, также называемое Рамановским рассеянием, представляет собой процесс неупругого рассеяния света молекулами вещества [5]. Спектроскопия КР является эффективным неразрушающим методом анализа, изучения состава и строения веществ. Метод КР может использоваться также и для изучения квантово-размерных эффектов в нк-Si, в том числе при их растворении [6].

В работе мезо-пористые кремниевые пленки были получены методом электрохимического травления пластин кристаллического кремния (с-Si) с кристаллографической ориентацией поверхности (100), р-типа проводимости с удельным сопротивлением 0.001 Ом*см. КНЧ были получены измельчением пористых пластин в планетарной шаровой мельнице в изопропанол. Для покрытия КНЧ ПЭГ, наночастицы (~1 мг) и исходный раствор мПЭГ-силан (5 кДа) (5 мг/мл, 200 мкл) диспергировали в этаноле (800 мкл), а затем перемешивали с помощью вортекса при комнатной температуре (25°C) в течение 2 ч по методике [7]. Адсорбция ПЭГ на поверхности частиц осуществляется через силановые группы ПЭГ и ОН- связи на поверхности наночастиц [8]. Полученные частицы промывали 3 раза этанолом с использованием центрифугирования (14 000 об/мин, 15 мин) для удаления, не связанного ПЭГ [9]. Морфологию наночастиц изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа Carl Zeiss ULTRA 55 FESEM. Размер наночастиц оценивали с помощью метода динамического рассеяния света. Эффективность адсорбции ПЭГ оценивали по данным ИК-спектроскопии на приборе FTIR (инфракрасная спектроскопия с

преобразованием Фурье), Bruker IFS 66v/S. Спектры КР изучали на конфокальном рамановском микроскопе (WITec, Ulm, Germany) с длиной волны возбуждения лазера 633 нм и объективом x50.

Растворение наночастиц в воде и PBS наблюдали по снижению интенсивности и низкочастотному сдвигу в их спектрах КР (рис. 1). Показано, что покрытие наночастиц ПЭГ увеличивает время их растворения: на спектрах наблюдается медленное снижение интенсивности при инкубации в воде и более быстрое – при инкубации в PBS. Вода в данном случае является моделью хранения КНЧ, а PBS имитирует клетку организма. Рассчитанные значения интегральных интенсивностей сигналов позволили определить процентное соотношение кристаллической и аморфной кремниевой фазы в КНЧ при инкубации в воде: 64,7% и 35,3% в нулевой день и 45,8% и 54,2% на пятый день соответственно. При инкубации в PBS соотношение кристаллической и аморфной кремниевой фазы в КНЧ получилось следующее: 42,4% и 57,6% через час и 22,7% и 77,3% через 24 часа соответственно.

Результаты работы будут использованы для разработки функциональных систем доставки лекарств на основе ПЭГ-КНЧ с заданным временем биodeградации, что может использоваться для устойчивого высвобождения лекарств и разработки новых подходов в тераностике заболеваний.

Работа выполнена под руководством с.н.с. Осминкиной Л.А. при поддержке гранта РНФ № 23-15-00268.

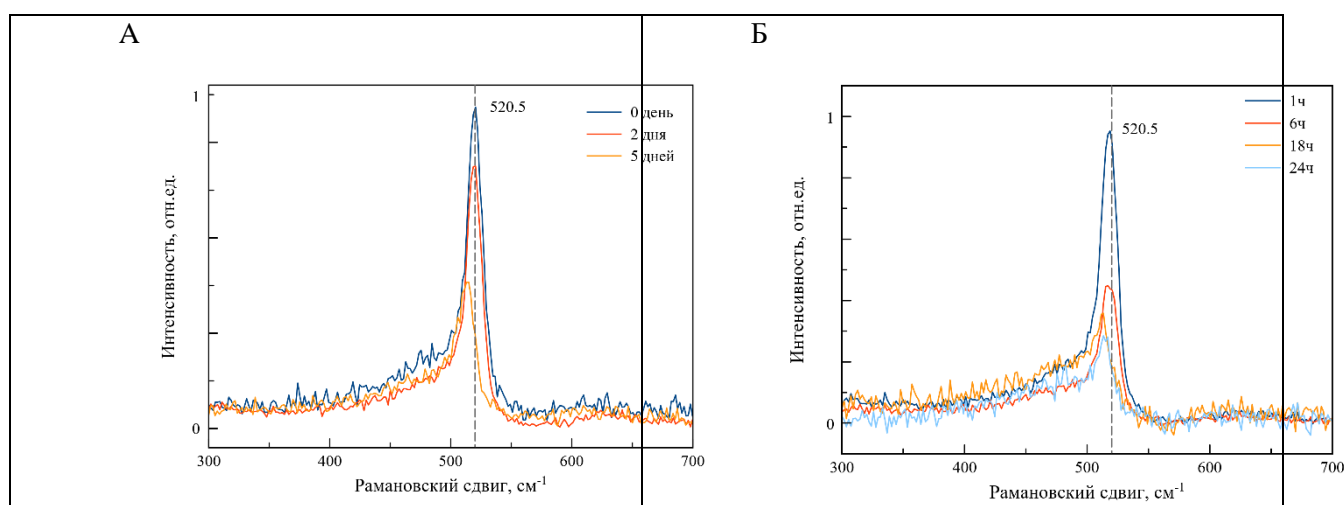


Рисунок 1. Рамановский спектр растворения КНЧ, покрытых ПЭГ; (А) При инкубации в воде; (Б) При инкубации в PBS.

Литература

1. Santos H.A., Mäkilä E., Airaksinen A.J., Vimbo L.M., Hirvonen J. Porous silicon nanoparticles for nanomedicine: preparation and biomedical applications // *Nanomedicine*, vol.9, no.4. 2014
2. Ji-Ho P. et al. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications // *Nature materials*, vol. 8, 2009. С. 331-336.
3. Peng K.Q., Yan Y.J., Gao S.P., Zhu J. // *Adv. Mater.* 2002. 14, N 1. P. 1164.
4. Otsuka H., Nagaasaki Y., Kataoka K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009
5. Raman C.V., Krishnan K.S. A New Type of Secondary Radiation // *Nature*, 1928, 121, pp. 501-502.
6. Гонгальский М.Б., Цурикова У.А., Гончар К.А., Гвинджилия Г.З., Осминкина Л.А. // *Физика и техника полупроводников*. 2021. № 1. С. 43.
7. Максимова Д.Е. и др. Метод спектроскопии комбинационного рассеяния света для мониторинга процесса растворения нанокристаллов кремния в модельных жидкостях и живых клетках // *Ученые записки физического факультета Московского Университета*, 2021. т. 2, С. 1-7
8. Ma K. et al. Elucidating the Mechanisms of Silica Nanoparticle PEGylation Processes Using Fluorescence Correlation Spectroscopies // *Chemistry of Materials*, 2016. С. 1537-1545
9. Kang R.H., Lee S.H., Kang S., Kang J., Hur J.K., Kim D. Systematic Degradation Rate Analysis of Surface-Functionalized Porous Silicon Nanoparticles // *Materials* 2019, 12(4), 580

Взаимодействие тиосульфатного нитрозильного комплекса железа с глутатионом и цитохромом С

А.Б. Кусянкулова^{1,2}, О.В. Покидова², Н.А. Санина^{1,2,3}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

²Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН

³Научно-образовательный центр «Медицинская химия» Московского государственного областного университета г. Мытищи

Динитрозильные комплексы железа, синтетические аналоги железо-серных нитрозильных комплексов, являющихся относительно стабильной формой существования NO в организме, имеют ряд преимуществ перед другими классами экзогенных доноров NO. Они действуют при низких концентрациях, не требуют дополнительной активации и имеют в своей структуре два фармакоактивных фрагмента. В данной работе мы исследовали комплекс $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ТНКЖ) (рис.1) [1]. Это биядерный анионный комплекс, в состав которого входит 4 NO группы и два тиосульфатных лиганда. Известно, что этот комплекс проявляет антимагистатическую активность по отношению к меланоме B16 и LL-карциноме [2]. Важным этапом исследований для дальнейшего использования этого класса соединений является изучение механизмов разложения и трансформации в модельных биологических системах. Особое внимание следует обратить на возможные реакции обмена тиоловых лигандов ТНКЖ на биологически важные тиолы *in vivo*. В качестве объектов исследований были выбраны глутатион (GSH) и цитохром С (Cyt C). Глутатион - самый распространенный небелковый тиол в живых организмах, выполняющий множество функций [3]. Цитохром С известен своей функцией в митохондриях в качестве ключевого участника процесса жизнеобеспечения клетки - синтеза АТФ [4].

Целью данной работы является изучение взаимодействия тиосульфатного нитрозильного комплекса железа с восстановленным глутатионом и ферро- и феррицитохромом С.

В ходе работы было изучено разложение ТНКЖ в водном буферном растворе (при pH 3.0 и 7.0), в присутствии глутатиона и в присутствии ферро- и феррицитохрома С методами УФ-видимой спектроскопии и реакции Грисса. В системе с GSH в УФ-спектрах появляются два максимума при 312 и 363 нм, характерные для глутатионового биядерного комплекса, которые отсутствуют в спектре исходного комплекса. В присутствии глутатиона процесс генерации NO становится более пролонгированным в 100 раз. В системе с ферроцитохромом С в спектрах поглощения наблюдаются два максимума при 541 и 565 нм, характерные для нитрозилированного Cyt C²⁺. В смеси с феррицитохромом С в спектре поглощения появляются два максимума на 527 и 560 нм, характерные для нитрозилированного Cyt C³⁺. В присутствии ферроцитохрома С количество образующихся нитрит-ионов в 10 раз меньше, а в присутствии феррицитохрома С – в два, чем в их отсутствии, что объясняется нитрозилированием белков.

Работа выполнена по теме Государственного задания, № гос. регистрации № АААА-А19-119071890015-6

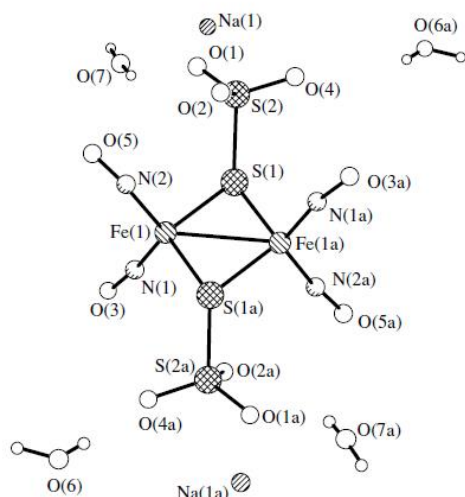


Рисунок 1. Молекулярная структура ТНКЖ $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Литература

1. *Sanina N.A. et al.* Synthesis, Structure and Solid-Phase Transformations of Fe Nitrosyl Complex $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ // Russian Journal of Coordination Chemistry. – 2005. – V. 31(5). – P. 301-306.
2. *Санина Н.А.* и др. Противоопухолевая активность нитрозильных комплексов железа – новых доноров монооксида азота // Рос. хим. журн. – 2009. – V. 53, No 1. – С. 164-171.
3. *Kalinina E.V., Chernov N.N., Novichkova M.D.* Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes // Biochemistry. – 2014. – V. 79(13). – P. 1562-1583.
4. *Ow Y.-L.P., Green D.R., Hao Z., Mak T.W.* Cytochrome c: functions beyond respiration // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2008. – V. 9(7). – P. 532-542.

УДК 577.3

Исследование модельных ишемических зон в сердце крысы и возможностей их детектирования

К.О. Слепов, И. Прокопов, С.А. Щербина, М.М. Слотвицкий, А.К. Бережной, В.А. Цвеляя, К.И. Агладзе

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

За последние пятьдесят лет сердечная трансплантация стала золотым стандартом лечения для пациентов с терминальной стадией сердечной недостаточности и единственным решением для пациентов, позволяющим восстановить примерно 70% качества их жизни. По имеющейся статистике (американский реестр по донорству и трансплантации (OPTN)) лист ожидания пополняется новым пациентом каждые 10 минут, но число трансплантаций остается постоянным. Из-за увеличения среднего возраста населения, улучшения медицинской помощи при сердечной недостаточности и использования механической поддержки кровообращения в период ожидания трансплантации сердец спрос на жизнеспособные донорские сердца (аллотрансплантатов) значительно превышает предложение. Приблизительно 60% потенциальных аллотрансплантатов считаются неподходящими по разным причинам и впоследствии не пересаживаются [1, 2]. Текущий стандарт сохранения аллотрансплантата предполагает оценку пригодности сердца на основе косвенных факторов, в том числе длительности ишемии после изъятия органа у донора. Ишемия, превышающая 4 часа, значительно увеличивает риск первичной дисфункции трансплантата (ПДТ), что связано с 8% смертностью через 30 дней и повышенной смертностью через 5 и 15 лет после трансплантации. Во время сохранения сердца велик риск возникновения устойчивых функциональных изменений, например, очагов ишемии, образовавшихся во время извлечения сердца (время тёплой ишемии) и транспортировке в кардиоплегическом растворе (время холодной ишемии). Наличие таких очагов может привести к непредсказуемым послеоперационным аритмиям и даже отторжению сердца (не связанным с несовместимостью по HLA-гену) [3].

Целью данной работы является моделирование ишемии для создания шкалы оценки обратимости ишемической болезни сердца. То есть, исследование обратимости ишемии на смоделированных на сердце крысы зонах повреждений в зависимости от глубины залегания очага и степени поражения участка сердечной ткани. Одной из задач данной работы являлось исследование возможности детектирования с помощью NADH-картирования ишемических повреждений сердца, находящихся не на его поверхности.

В ходе исследования распространения очага ишемии в ткани были проведены эксперименты с имитацией тромбоза в сосудистой системе сердца. В первом исследовании имитация тромбоза происходила с использованием полимерных шариков различного диаметра.

При закупорке полимерным шариком сосуда или капилляра область, не снабжаемая из-за этого кислородом, переносимым с жидкостью, ишемизируется. При этом закупоренный сосуд может находиться на разной глубине под поверхностью ткани. Длительность отклика на закупорку в фиксированном устройстве сигнале может дать оценку скорости роста очага ишемии в ткани. В качестве другого способа создания контролируемого очага ишемии был выбран следующий метод: вместо введения шариков в орган, сердце подвергалось воздействию медицинских игл. В результате вокруг точки проникновения должен возникать очаг ишемии, растущий в ткани со временем. С помощью устройства выявлялся уровень фотообесцвечивания NADH и очаги ишемии в ткани, которые далее сопоставлялись с характером и местом проникновения иглы. Еще один способ создания контролируемого очага ишемии представлял собой выжигание ткани сердца для создания ишемической зоны. С помощью тонкой насадки на паяльник на поверхность сердца наносился ожог. Аналогично предыдущим экспериментам отслеживалась динамика роста очага ишемии.

С помощью полимерных шариков был смоделирован аналог тромбоза и наблюдались условия, при которых локальная ишемия может быть необратимой в таком случае. Глобальная ишемия была связана с необратимым изменением сосудистого русла. Это показано тем, что ишемия является необратимо растущей и прогрессирующей со временем вне зависимости от её интенсивности в конкретный момент времени. Вероятность возникновения необратимых изменений сосудистого русла во время перфузии во много раз ниже чем при естественной работе сердца. Если такое событие всё же произошло, то исправить его перфузией невозможно, а зафиксировать отмирание кардиомиоцитов из-за локальной ишемии оказалось возможно при помощи NADH-картирования (рис. 1).

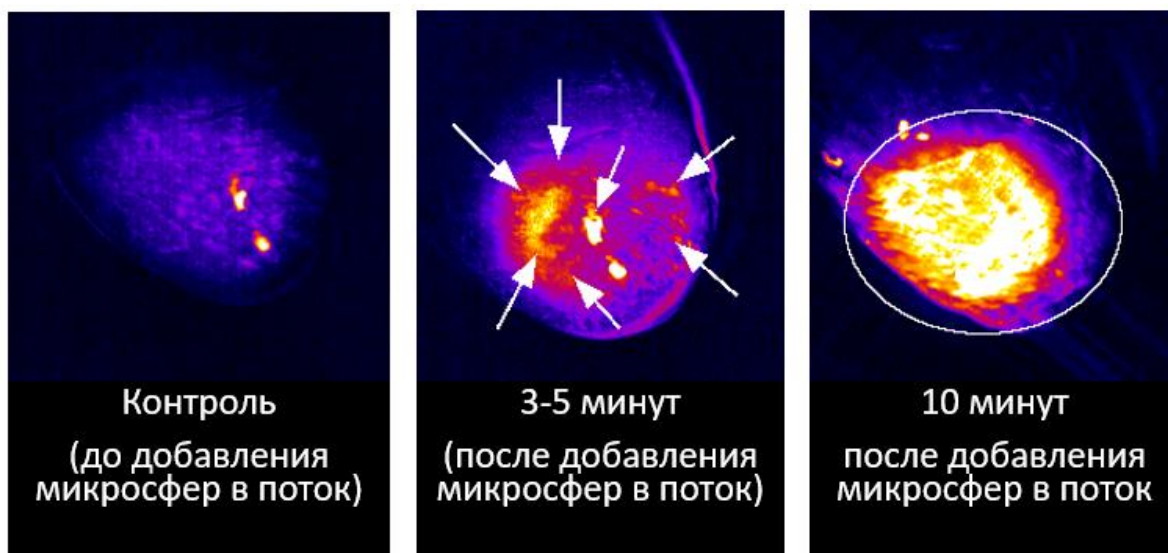


Рисунок 1. Карты стандартных отклонений от контроля интенсивности динамики свечения NADH в сердце крысы в разное время добавления микросфер в поток перфузии через сердце.

Эксперименты с иглой также показали, что ишемическая зона прогрессирует со временем и меняется в зависимости от глубины залегания повреждения. Был сделан вывод, что даже, если повреждение или ишемия происходит в глубине, мы будем наблюдать ее на поверхности, абсолютно аналогично, как если бы повреждение было на поверхности. Выжигание ткани в эксперименте мы считали аналогом абляции, что позволило нам проверить распространение ишемии от термического повреждения поверхности сердца. Характер распространения очагов от термических повреждений со временем более медленный и затухающий, но аналогичен на поверхности тому, как это происходит в случае внутренних повреждений сердца. Данные повреждения носят необратимый характер.

Литература

1. *Mc Carthey S.L., Patel C., Del Rio J. et al.* Long term outcomes and management of the heart transplant recipients // *Best Pract Research Clin Anesthesiol.* – 2017. – Vol.31 (2) . – P. 237-248
2. *Beuth J., Falter F., Ribeiro R.V.P., Badiwala M., Meineri M.* New strategies to expand and optimize heart donor pool: ex vivo heart perfusion and donation after circulatory death: a review of current research and future trends. *Anesthesia & Analgesia*, (2019). 128(3), 406-413.
2. *Lobo M.C.* Indications and outcome in adult heart transplantation. (2019). [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://core.ac.uk/download/pdf/286574957.pdf](https://core.ac.uk/download/pdf/286574957.pdf)

Исследование влияния нанесения биоактивного покрытия на взаимодействие поверхности пористых каркасов для сосудистых протезов малого диаметра с эндотелиальными клетками

А.И. Хайруллина¹, Е.А. Немец², В.Ю. Белов², В.И. Севастьянов²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Отдел биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО имени академика В.И. Шумакова»

Сердечно сосудистые заболевания являются одной из основных причин смертности населения по всему миру. С возрастом сосуды становятся более хрупкими и теряют свою эластичность, а образование атеросклеротических бляшек приводит к сужению их просвета, вызывая ишемические болезни сердца и головного мозга. В связи с нехваткой донорского материала, а также иммунного ответа организма при шунтировании или замене сосуда существует необходимость в создании искусственных трансплантатов из биосовместимых и биорезорбируемых полимеров. Они должны иметь близкие к нативным сосудам физико – механические свойства и служить субстратом для адгезии и пролиферации клеток, создавая при этом нужную архитектуру, а также в перспективе заменяться собственной тканью организма.

На данный момент не существует трансплантатов сосудов малого диаметра (менее 6 мм), успешно функционирующих в клинике. Одним из важнейших свойств протезов кровеносных сосудов является его способность взаимодействовать с эндотелиальными клетками (ЭК), монослой которых, образующийся на внутренней поверхности протеза после имплантации, препятствует процессу тромбообразования и регулирует иммунные и воспалительные реакции. Для стимуляции ангиогенеза часто используют биоактивные молекулы (сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), тромбоцитарный ростовой фактор (PDGF) и др.), которые способствуют миграции и пролиферации клеток и образованию новой ткани. Создание биоинженерной конструкции кровеносных сосудов малого диаметра с биоактивным покрытием, включающим факторы роста сосудистого эндотелия, является перспективным направлением.

Целью нашей работы была модификация пористого трубчатого каркаса (ПТК) для повышения адгезии и пролиферации эндотелиальных клеток при сохранении оптимальных физико – механических характеристик.

Для формирования ПТК использовался современный высокотехнологичный метод электроспиннинга, позволяющий создавать высокопористые каркасы, состоящие из волокон диаметром 0,1 – 10 мкм. Каркасы формировали из биодеградируемого полиэфира – поликапролактона (ПКЛ) и его смеси с желатином, для уменьшения хирургической проницаемости стенки сосуда. ПТК диаметром 3 мм из 10% раствора ПКЛ в дихлорметане формировали на установке NANON-01A (“МЕСС СО”, Япония) при скорости нанесения 4 мл/ч и объемом нанесения 2 мл, напряжение между электродами 25 кВ, расстояние до коллектора 100мм, скорость вращения 1000 об/мин, игла 18G [1]. Биоактивный слой был сформирован из антикоагулянта крови гепарина и лизата тромбоцитов человека в качестве источника факторов роста. Структуру поверхности каркасов анализировали на электронном микроскопе JSM-6360LA (“JEOL”, Япония). Физико-механические свойства каркасов исследовали на испытательной (разрывной) машине Shimadzu EZ Test EZ-SX (Shimadzu Corporation, Япония), регистрируя максимальное удлинение в %, усилие до разрыва в Ньютонах (Н) и модуль Юнга в мегапаскалях (МПа). Для культивирования использовали эндотелиальные клетки человека линии EA.hy926. Клеточную активность наблюдали на микроскопе Leica DMi8 Thunder, предварительно окрасив клетки витальным красителем Live/Dead®.

Полученные ПТК имели физико – механические параметры близкие к нативным сосудам: максимальное удлинение - 216 ± 32 %, усилие до разрыва - 5.5 ± 0.4 Н и модуль Юнга 4.8 ± 0.8 Мп. Для уменьшения обнаруженной высокой водопроницаемости каркасов (с 42.3 ± 3.7 мл/(см² мин) до 3.4 ± 0.1 мл/(см² мин)) был изготовлен трехслойный каркас с добавлением водозапирающего слоя из смеси ПКЛ с желатином (30% желатина по массе полимера), что не повлияло на физико – механические характеристики образцов и их биосовместимость.

Нами была проведена биофункционализация образцов гепарином [2], который является антикоагулянтом и способен связываться с факторами роста, и лизатом тромбоцитов с высоким содержанием ростовых факторов. В ходе работы было рассмотрено взаимодействие культуры эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 с внутренней поверхностью ПТК через 24 ч и 168 ч после посева. Везде наблюдались преимущественно живые клетки. Имобилизация только ГП не сопровождается значительными изменениями адгезии и пролиферации клеток, а добавление лизата –

способствует адгезии, распластыванию и стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток с формированием монослоя через 168 ч культивирования. Также было подсчитано количество живых клеток. К концу срока культивирования, через 168 ч, количество ЭК на внутренней поверхности исследуемых каркасов с добавлением гепарина и лизата тромбоцитов увеличивается в 3,6 раза ($60,4 \pm 1,8 \times 10^3$ кл), а разница в количестве клеток на внутренней поверхности исходного немодифицированного и модифицированного гепарином каркасов незначительна.

Таким образом, нами было изучено влияние нанесенного биоактивного покрытия на адгезию и пролиферацию эндотелиальных клеток. Экспериментальные данные позволяют прийти к заключению, что покрытие способствует эндотелизации поверхности пористых трубчатых полимерных каркасов из поликапролактона, полученных методом электроспиннинга в условиях *in vitro*.

Литература

1. Немец Е.А., Сургученко В.А., Белов Ю.В., Хайруллина А.И., Севастьянов В.И. Пористые трубчатые каркасы для тканеинженерных конструкций кровеносных сосудов малого диаметра // Перспективные материалы. 2022. №11. С. 36-46.

2. Сургученко В.А., Немец Е.А., Белов В.Ю., Севастьянов В.И. Биологически активное покрытие для тканеинженерной конструкции кровеносных сосудов малого диаметра // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2021. Т.23. №.4. С. 119-131.

УДК 577.35

Применение машинного обучения и статистического анализа для исследования параметров нейронной активности бледного шара, связанных с тяжестью дистонии

А.А. Садекова^{1,2}, И.З. Джалагония², А.С. Седов^{1,2}

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

² ФГБУН ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН

Дистония – это двигательное расстройство, характеризующееся избыточностью движений: непроизвольными мышечными сокращениями и тремором. Одной из структур головного мозга, задействованных в патогенезе дистонии, является бледный шар (*globus pallidus*, GP), являющийся частью системы базальных ядер [1]. Изменения в нейронной активности бледного шара могут играть важную роль в патофизиологии дистонии, однако, сам механизм не до конца изучен. Также остаются неизвестными конкретные параметры электрической активности нейронов бледного шара, влияющие на тяжесть проявления симптомов.

Целью данного исследования было выявление ключевых параметров нейронной активности бледного шара, ассоциированных с тяжестью дистонических симптомов, с помощью методов машинного обучения и статистического анализа.

Данные были получены во время стереотаксических операций по вживлению электрода для DBS (*deep brain stimulation*, глубоинной стимуляции мозга). Во время операции велась микроэлектродная регистрация активности одиночных нейронов бледного шара (внутренней и внешней его части) у 31 пациента с различной степенью тяжести дистонии.

Всего была проанализирована активность 1883 нейронов, которые были разделены на три группы в зависимости от паттерна активности: тонические, паузные и паченые. Разделение нейронов производилось с помощью метода иерархической кластеризации. Нейронная активность описывалась такими параметрами как частота импульсации, длительность пауз между импульсами, коэффициент вариации и др (всего 32 параметров). Тяжесть дистонии оценивалась с использованием стандартизированных шкал клинической оценки, таких как шкала оценки дистонии Берка-Фана-Марседена (BFMDRS); также пациенты были разделены на два класса по количеству вовлечённых в заболевание сегментов тела (тяжёлая форма (4 сегмента и более) и лёгкая форма дистонии (3 сегмента и менее)). Анализ производился при помощи обобщённой линейной модели (GLM), а также классификационного и регрессионного алгоритмов градиентного бустинга, реализованного в библиотеке CatBoost на языке Python 3.

Наибольшую важность для прогнозирования тяжести дистонии показали следующие параметры нейронной активности внутренней части бледного шара: параметры, описывающие ритмическую активность на частотах 60-90 Гц, параметры, описывающие регулярность импульсов и параметры, описывающие паттерн пачки (Таблица 1). Данные параметры были значимыми во всех построенных моделях. Это позволяет предположить, что именно эти параметры нейронной

активности связаны с тяжестью дистонии, однако выявление причинно-следственных связей является гораздо более сложной исследовательской задачей, выходящей за рамки данной работы.

Полученные данные будут способствовать лучшему пониманию патофизиологии дистонии и могут помочь определить потенциальные цели для терапевтического вмешательства, например, для технологии адаптивной глубокой стимуляции мозга.

Таблица 1. Таблица важности параметров нейронной активности внутренней части бледного шара для обобщенной линейной модели. Параметр *oscore_60.0_90.0* описывает ритмическую активность на частотах 60-90 Гц, *mean_spikes_in_burst* – среднее количество спайков в пачке, *frequency_variance* – частотная вариативность, *mean_isi_in_burst* – среднее межспайковое расстояние в пачке, *median_isi_in_burst* – медианное межспайковое расстояние в пачке

Параметр	p-value
<i>oscore_60.0_90.0</i>	0,000141
<i>mean_spikes_in_burst</i>	0,002968
<i>frequency_variance</i>	0,004114
<i>mean_isi_in_burst</i>	0,005399
<i>median_isi_in_burst</i>	0,007391

Литература

1. *Vitek J.L.*, Pathophysiology of dystonia: A neuronal model. *Mov. Disord.* 2002. V. 17. P. 49-62

УДК 577.35

Разработка новых протоколов химической трансдифференцировки фибробластов в кардиомиоциты с помощью биоинформатического прогнозирования сигнальных путей

Е.А. Турчанинова, А.А. Аитова, С.А. Щербина, В.А. Цвеляя, М.М. Слотвицкий, К.И. Агладзе
Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Нарушение нормального режима распространения электрических волн в сердечной ткани может стать причиной сердечной аритмии, асинхронных сердечных сокращений и даже способно привести к остановке сердца или внезапной сердечной смерти. Электрические волны передают возбудимые клетки – кардиомиоциты. Чрезмерное содержание фибробластов в сердечной ткани мешает распространению электрических сигналов. Такое нарушение называется фиброзом, оно является частой причиной аритмии.

Представленная работа посвящена разработке протоколов химической трансдифференцировки фибробластов в кардиомиоциты. Осуществление прямого репрограммирования без стадий эмбрионального клеточного развития [1, 2, 3] позволит осуществить новые подходы в области терапии фиброзных изменений сердца. Основной целью данной работы было создание новых протоколов трансдифференцировки из фибробластов в кардиомиоциты человека с повышенной эффективностью и проверкой функциональности получаемых клеток. В задачу работы входили в том числе подбор и постановка контрольных протоколов трансдифференцировки для фибробластов животных, их последующая модификация и разработка протоколов трансдифференцировки для фибробластов человека на основе контрольных.

Для решения представленных задач в работе использовались эмбриональные фибробласты крысы и мыши, а также иммортализованные фибробласты человека. Был поставлен контрольный протокол трансдифференцировки для эмбриональных фибробластов мыши, который был перенесен на эмбриональные фибробласты крысы. Полученные кардиомиоциты были проанализированы с точки зрения функциональной и электрофизиологической зрелости. На основе поставленного протокола начата дифференцировка человеческой клеточной линии фибробластов *trc-5* (иммортализованные). Протокол был модифицирован в соответствии с первыми попытками трансдифференцировки и переносом на регуляторные сигнальные пути человека. Далее, данный протокол будет совершенствоваться для увеличения выхода кардиомиоцитов.

Литература

1. Tamer M.A., Mohamed Ph.D., Stone N.R., et al. Chemical Enhancement of In Vitro and In Vivo Direct Cardiac Reprogramming // 2017 Mar 7;135(10):978-995. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024692.
2. BurrIDGE P.W., Matsa E., Shukla P., Lin Z.C., et al. Chemically Defined and Small Molecule-Based Generation of Human Cardiomyocytes // Nat Methods 11, 855–860 (2014). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2999>
3. Lian X., Zhang J., Azarin S.M., Zhu K., et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions // Nat Protoc. 2013 Jan;8(1):162-75. doi: 10.1038/nprot.2012.150. Epub 2012 Dec 20.

УДК 577.352.2

Мультимодальный сенсор одиночных белков и активности белковых комплексов

К.А. Иванова^{1,2}, П.В. Башкиров^{2,3}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²ФГБУ Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства

³ФБУН НИИ СБМ Роспотребнадзора

Детекторы на основе нанопор зарекомендовали себя как выдающийся инструмент для детекции и исследования одиночных молекул и комплексов нативных белков. Метод основан на измерении скачков ионного тока, текущего через нанопору, при попадании внутрь просвета нанопоры макромолекулы. На сегодняшний день уже разработано и успешно реализуется большое количество технических решений применения нанопор как для секвенирования ДНК, так и для детекции и исследования одиночных белков. Для разработки сенсоров одиночных молекул обычно используются бочкообразные каналы шириной в несколько нанометров, но последнее время значительный научный и технологический интерес сфокусирован на создании более широких структур с регулируемой формой и/или свойствами, позволяющим подстраивать параметры поры к характеристикам исследуемого объекта. Одним из подходов является модификация твердотельных нанопор жидкокристаллическим липидным бислоем, который позволяет сопрячь перенос молекулы анализита по поверхности липидного бислоя с транспортом через просвет нанопоры, за счет чего можно добиться специфичности, увеличения продолжительности сигнала и предотвратить забивание нанопоры [1, 2]. В тоже самое время липидный бислой обладает изгибной жесткостью, что позволяет формировать из него стабильные ультракороткие липидные нанотрубки (укНТ), геометрические характеристики которых соответствуют размерам нанопор [3]. В данной работе мы демонстрируем, что помимо классического модуса операнди – детекции молекул внутри просвета, измерение ионного тока позволяет регистрировать локальные изменения формы НТ вследствие адсорбции на ее внешнюю поверхность одиночных молекул и молекулярных комплексов, а также различать молекулы по характеру индуцированных ими деформаций – в зависимости от геометрии взаимодействующей с мембраной поверхности белка происходит продавливание или вспучивание мембраны укНТ. На примере белков динамин1 и динамин2 мы демонстрируем возможность выявления различий в кинетике олигомеризации и АТФазной активности одиночных белковых комплексов на поверхности мембраны укНТ, опосредующих ее деление. Более того, инкорпорирование в мембрану трансбислойных заряженных молекул позволяет контролировать процесс переноса белков по поверхности укНТ и управлять образованием их комплексов/полимеризацией с помощью электрического поля. Таким образом, на примере укНТ нами показана принципиальная возможность создания мультимодального сенсора одиночных молекул, который позволяет работать как с одиночными молекулами, так и с их комплексами. Предложенный метод контролируемого привлечения белков на поверхность НТ значительно расширяет диапазон белков, которые могут быть изучены и/или распознаны по характерным отпечаткам.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-15-00265.

Литература

1. Yusko E.C., Johnson J.M., Majd S. Controlling protein translocation through nanopores with bio-inspired fluid walls // Nature nanotech. 2011. P. 253-260.
2. Eggenberger O.M., Leriche G., Koyanagi T., Ying C., Mayer M. Fluid surface coatings for solid-state nanopores: comparison of phospholipid bilayers and archaea-inspired lipid monolayers // *Nanotechnology* 2019. V. 30 325504.
3. Bashkirov P.V., Kuzmin P.I., Chekashkina K. Reconstitution and real-time quantification of membrane remodeling by single proteins and protein complexes // *Nature Protocols* 2020. V. 15. P. 2443-2469.

Разработка метода управляемой визуализации клеточных и молекулярных структур и исследование его характеристик на модели фиксированного микропрепарата эритроцитов

К.С. Степовой¹, И.А. Сидоров²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно – технологический университет Сириус»

Благодаря развитию компьютерных технологий и машинного обучения появляется возможность разрабатывать новые и реализовывать ранее недоступные методы исследований в клеточной и молекулярной биологии. В частности, одной из важных прикладных задач является изучение взаимодействия микропрепаратов клеточных культур и тканей со светом [1]. Однако, в силу проприетарности ПО и закрытого дизайна микроскопов, функционал большинства существующих методов развивается медленно, заметно отставая от новейших достижений в области компьютерных технологий и программного обеспечения. Таким образом, крайне актуальной является разработка модульных исследовательских микроскопов и методов на их основе с открытой, доступной для модернизации и конструктивной модификации, архитектурой совместимой с открытым программным обеспечением.

В данном исследовании мы разработали экспериментальную установку – модульный инвертированный флуоресцентный микроскоп с модулем одновременного освещения различных участков микропрепарата под управлением открытого программного обеспечения. Благодаря оптимизации используемых компонентов нам удалось добиться латерального разрешения микроскопа 0.8 мкм при размере рабочей области 1000 мкм, что близко к теоретическому пределу разрешения для длины волны 532 нм и используемого 32х объектива.

Также было проведено исследование предела детекции установки в эксперименте с последовательно разбавленными образцами флуоресцентного красителя родамина 6G. Предел детекции красителя составил 0,1 нг/мл.

Более того, мы совместили экспериментальную установку с модулем контролируемой фотоактивации флуоресценции на базе DLP [2] проектора, что позволило получить четкое и контрастное изображение выбранных участков микропрепарата эритроцитов лягушки с разрешением 1,3 мкм. Главной особенностью разработанного метода является возможность выбора в режиме светлого поля конкретных клеток в исследуемой культуре, в которых требуется возбуждения флуоресценции. Более того, благодаря высокому разрешению системы нам удалось провести возбуждение флуоресценции исключительно ядер клеток на фоне невозбужденных клеток.

Таким образом, в результате работы выявлено, что характеристики разработанного метода позволяют использовать его для работы с реальными образцами клеток, а именно, проводить одновременную визуализацию и возбуждение флуоресценции нескольких отдельных пространственно разделенных участков. При этом важной особенностью метода в силу модульности установки является отсутствие принципиальных физических ограничений модернизации, благодаря чему при добавления новых модулей он может быть адаптирован под широкий спектр задач, включая оптогенетику [3] или исследование кинетики роста клеток.

Литература

1. *Boyden E., Zhang F., Bamberg E.* Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity // *Nat Neurosci.* 2005. V. 8. P. 1263.
2. *Samson E.C., Blanca C.M.* Dynamic contrast enhancement in widefield microscopy using projector-generated illumination patterns // *New J. Phys.* 2007. V. 9. P. 363.
3. *Pena E., Berciano M., Fernandez R, Ojeda J., Lafarga M.* Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons // *Journal of comparative neurology.* 2001.V. 430, P. 250.

Разработка метода регистрации колориметрических и флуоресцентных/люминесцентных меток в иммунохроматографических тест-системах

Е.В. Табунов¹, И.А. Сидоров²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет Сириус»

Оптимизация методов регистрации биомолекул является важной задачей для повышения точности диагностики заболеваний. Активно развивающаяся диагностика РОС (point of care, «по месту обращения») с помощью быстрых и относительно дешевых тест систем на основе иммунохроматографического анализа в ряде случаев хорошо зарекомендовала себя как эффективная альтернатива клиническим методам детекции, требующим длительных пробоподготовки и проведения тестов. Основным недостатком иммунохроматографии является качественный или полуколичественный формат анализа. Хотя для количественной регистрации окрашенных меток известны аппаратные решения на основе сканеров [1], их функционал ограничен главным образом оптическим диапазоном регистрации и неспособностью к детекции флуоресцентных и хемилюминесцентных меток.

Данная работа направлена на решение задачи по разработке простого и удобного в применении метода, позволяющего количественно регистрировать широкий спектр оптических (окрашенных, флуоресцентных и хемилюминесцентных) меток на иммунохроматографических тест-полосках.

В работе был создан прототип прибора и на его основе метод, позволяющий количественно регистрировать указанные типы меток на иммунохроматографических тест-полосках. Метод позволяет измерять яркость зон тест-полоски с иммобилизованными метками. Прототип прибора состоит из светочувствительной камеры, которая размещена в верхней части корпуса, светоизолированного рабочего пространства, внутренней равномерной подсветки исследуемых образцов белым светом. На внутренней поверхности стенки прибора также смонтирован модуль с флуоресцентным осветителем и светофильтром возбуждения с длиной волны 630 нм. Регистрацию изображений проводили с использованием открытого программного обеспечения Micromanager [2] с последующей обработкой его в ICY и ImageJ [3] для измерения интенсивности зон тест-полосок с метками.

Разработанный метод был протестирован на примере комбинированного иммунохроматографического анализа для одновременного проведения ДНК- и иммуноанализа с использованием различных флуоресцентных, хемилюминесцентных и окрашенных меток, в качестве которых были использованы краситель Су-5, люцифераза nanoLuc и золотые наночастицы, соответственно. Тестирование проводилось на реальных образцах сыворотки крови мыши, на комбинированных тест-полосках с одновременно иммобилизованными олигонуклеотидами и моноклональными антителами. Разработанный метод позволил детектировать краситель Су-5 с пределом обнаружения 256 нг/мл. В режиме измерения хемилюминесценции при использовании объектива со светосилой 0,95 был достигнут предел детектирования 100 нг/л люциферазы nanoLuc.

Таким образом, показано, что разработанный аппаратный метод позволяет реализовать количественное детектирование комбинированных аналитов с использованием флуоресцентных, хемилюминесцентных и окрашенных меток в формате иммунохроматографического анализа и имеет высокий потенциал для практического использования в клинической практике.

Литература

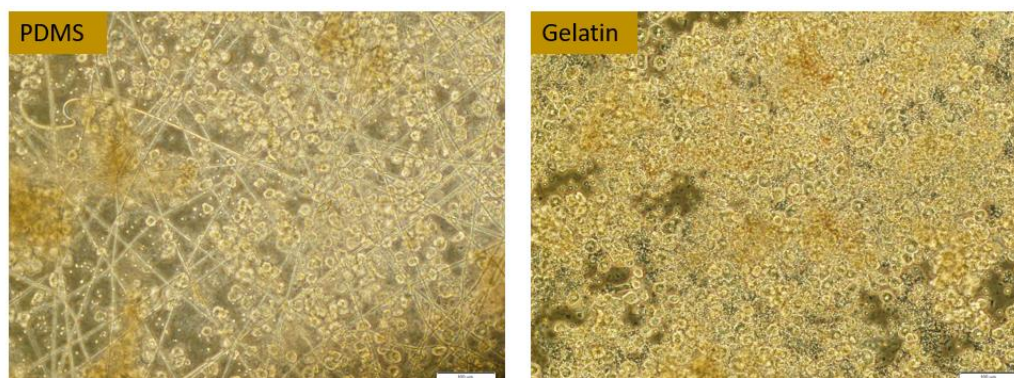
1. Урусов А.Е., Жердев А.В., Старовойтова Т.А., Венгеров Ю.Ю., Дзантиев Б.Б. Приборная регистрация иммунохроматографических экспресс-тестов // Клиническая лабораторная диагностика. 2016. №61 (3). С. 173-179.
2. <https://micro-manager.org/>
3. <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>

Исследование зависимости функциональности гепатоцитов на примере концентрации концентрации альбумина от адгезивных свойств подложек*С.С. Бакуменко¹, С.А. Щербина¹, А.А. Аитова¹, В.А. Цвеляя^{1,2}, К.И. Агладзе^{1,2}*¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)²ГБУЗ МО МНИКИ им. М.Ф. Владимирского

Одной из наиболее актуальных задач современной медицины является развитие персонализированных методов лечения болезней печени. Актуальность данной проблемы объясняется острым недостатком донорских органов и сниженной продолжительностью жизни реципиентов после ортотопической трансплантации печени. На сегодняшний день среди альтернативных путей компенсаторной терапии печени стоит выделить следующие биоинженерные подходы: пересадка части органа и клеточных структур, использование аппаратов искусственного диализа и 3D-биопринтинг [1]. В рамках представленной работы мы разрабатываем принципиально новый метод компенсаторной терапии: портативное устройство со сменными биокартриджами. Преимущество использования данного устройства состоит в том, что сменный картридж с гепатоцитами не удерживает белковые молекулы, ответственные за тромбогенез, в отличие от полупроницаемой мембраны диализатора [2], а также в отсутствии иммунного отторжения, возникающего при пересадке органа или его части [3].

На первой стадии разработки был подобран и модифицирован протокол выделения гепатоцитов, основанный на принципе ферментативной перфузии печени, что позволило получить высокоочищенную клеточную культуру [4,5]. Среднее количество гепатоцитов, выделенных из крысиной печени, составляет ~10 млн клеток из 1 печени крысы. Далее осуществлялся подбор оптимальной подложки с соответствующими адгезивными свойствами. В результате тестирования 8 материалов было установлено, что наиболее подходящей подложкой служит полидиметилсилоксан (ПДМС), покрытый желатином и поликапролактоновыми волокнами (рис. 1). В процессе длительного культивирования шестнадцати линий гепатоцитов, выделенных из лабораторных крыс, было установлено, что клетки нормально функционируют вплоть до 25 дня, образуют кластерную структуру (рис. 2). Наглядным индикатором нормального функционирования гепатоцитов при их длительном культивировании является экспрессия альбумина. Проводился спектрофотометрический анализ растворов, которые накапливали альбумин в течение различного времени, вплоть до 7 дня (рис. 3).

На следующей стадии исследования будут проведены эксперименты по использованию гепатоцитов, выделенных из печени человека, на разработанном прототипе устройства.



Рисинук 1. Сравнение посадки клеток на ПДМС, покрытый желатином, и желатин без ПДМС на 2 сутки после посадки.

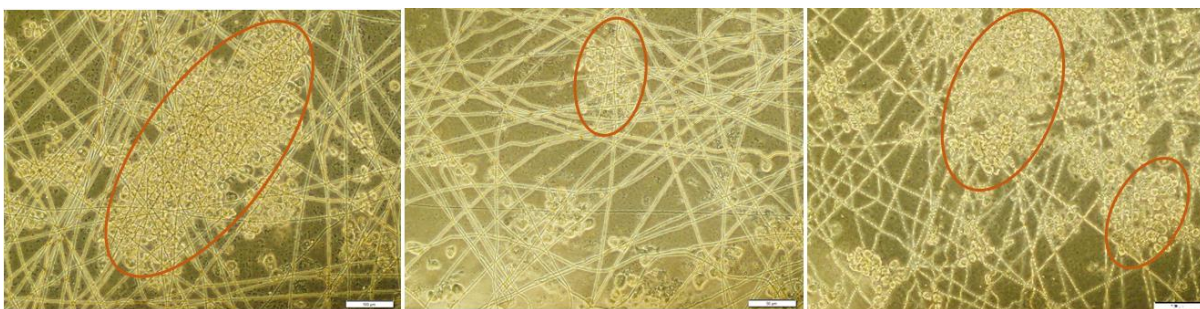


Рисунок 2. Пример кластерной структуризации гепатоцитов. Вытягивание кластеров по основному направлению волокон.

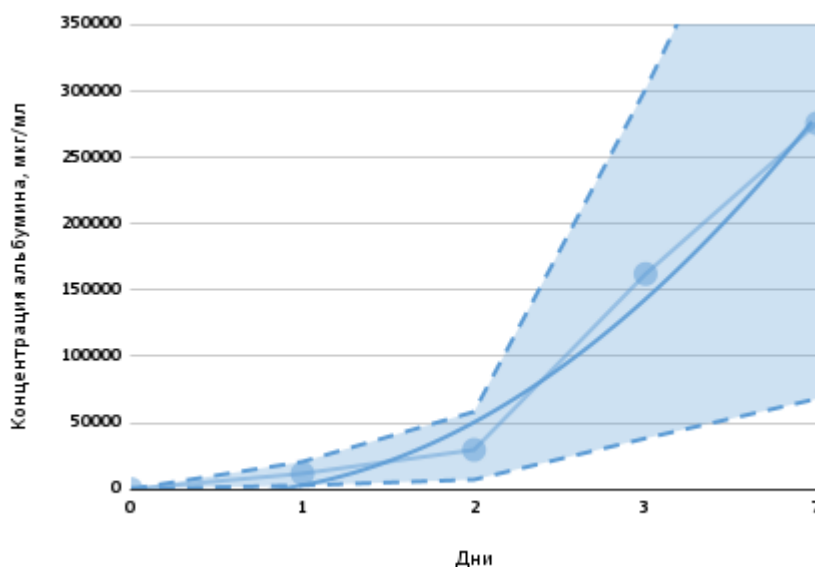


Рисунок 3. График зависимости концентрации синтезируемого альбумина в мкг/мл от дня измерения на подложке с желатином.

Литература

1. Lee S.Y., Kim H.J., Choi D. Cell sources, liver support systems and liver tissue engineering: alternatives to liver transplantation //International journal of stem cells. – 2015. – Т. 8. – №. 1. – С. 36.
2. Meijers B.K.I. et al. Major coagulation disturbances during fractionated plasma separation and adsorption //American Journal of Transplantation. – 2007. – Т. 7. – №. 9. – С. 2195-2199.
3. Du X. et al. Progress in liver transplant tolerance and tolerance-inducing cellular therapies //Frontiers in Immunology. – 2020. – Т. 11. – С. 1326.
4. Shen L. et al. Isolation and primary culture of rat hepatic cells //JoVE (Journal of Visualized Experiments). – 2012. – №. 64. – С. e3917.
5. Shulman M., Nahmias Y. Long-term culture and coculture of primary rat and human hepatocytes //Epithelial Cell Culture Protocols. – Humana Press, Totowa, NJ, 2012. – С. 287-302.

УДК 620.3

Получение и изучение модифицированных магнитоуправляемых липосом

А.Д. Кибирский

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

В современной медицине развивается персонализированный подход к лечению. Важным направлением такого подхода является тераностика, подразумевающая создание наносистем, которые могут являться одновременно и терапевтическим агентом, и средством ранней диагностики. Ключевые показатели тераносных систем: нетоксичность, возможность адресной доставки в определенное место и время выведения из организма [1]. Липопротеины обычно состоят из гидрофобного липидного ядра и внешней оболочки из фосфолипидов и амфипатических аполипопротеинов, которые обеспечивают растворимость в воде и точный контроль размера. Использование липопротеинов для доставки функциональных соединений имеет следующие преимущества: обход иммунной системы, длительное время циркуляции в крови, возможны различные

подходы к размещению лекарственного средства, внутри, на поверхности и за счёт конъюгации с белками, взаимодействие аполипопротеинов с липидным слоем способствует постоянному и воспроизводимому количеству аполипопротеинов на частицу и узкому распределению по размерам, преодолевая проблемы полидисперсности по размеру, а также обеспечивая адресную доставку лигандов [2]. Установлено, что включение в состав липосом полиэтиленгликоля (ПЭГ) позволяет увеличить время выведения из организма [1]. ПЭГ защищает липосомы от ферментативного разложения, дополнительно снижает вероятность иммуногенных реакций и выведение выделительной системой. Встраивание ПЭГ в липосомы не требует сайт-специфичной модификации поверхности. В качестве примера использования липосом для доставки функциональных соединений удобно использовать магнетит, который используется в терапии опухолей и легко детектируется [3]

В ходе работы были изучены методы получения липосом. Для образования липосом без с полиэтиленгликоля растворяли фосфатидилхолин и холестерин (7:3) в хлороформе. Превращение ПЭГ в организме человека в токсические метаболиты может быть индуцировано ферментом алкогольдегидрогеназой, молекулы ПЭГ массой выше 400 Да не подвергаются деградации ферментами. Поэтому для получения ПЭГ-липосом использовались фосфатидилхолин, D- α -токоферил ПЭГ (масса выше 400 Да) и холестерин в соотношении 65:10:25 соответственно. Далее выпаривая хлороформ при 60 °С и добавляя воду получали коллоидные растворы. Для получения магнетита использовали смесь гидратов хлористого железа и хлорного железа, раствор стабилизировался цитратом натрия. Для включения магнетита в липосомы полученный стабилизированный магнетит добавлялся к коллоидному раствору жиров, выпариванием удалялся хлороформ, и часть магнетита оказывалась внутри липидной оболочки. Очистку от невключённого в липосомы магнетита проводили двумя методами: с помощью постоянного магнита и в градиенте плотности. Для оценки эффективности разделения использовалась окраска по Перлсу. Разделённые на градиенте сахарозы липосомы дали окраску на 4 минуты позже, и меньшей интенсивности, чем разделённые постоянным магнитом, т.е. были более качественно очищены от избыточного магнетита. В дальнейшем использовали очистку в градиенте плотности, после двух этапов центрифугирования супернатанта с удалением надосадка и добавлением воды в третий раз после центрифугирования добавлялся натрий-фосфатный буфер (pH=7.4). Полученные липосомы вводились мышам в ретроорбитальный синус в объёме 100 мкл. Изменение концентрации магнитных частиц в циркулирующей крови оценивали с помощью магнитометра BioMag. Полученные времена полувыведения липосом, в которые не входил полиэтиленгликоль, равно (по результатам трёх измерений): $t_1=210\pm 44$ с, Для липосом с ПЭГ (по результатам двух измерений): $t_2=615\pm 5$ с. Возможные погрешности методики: липосомы могли сильно варьироваться по размерам. В дальнейшем предполагается снизить разброс в размерах липосом использованием роторного испарителя и фильтрацией полученных липосом через мембрану (рис. 1). Также возможно проникновение сахарозы через билипидные слои в липосому, что может привести к изменению физико-химических свойств, планируется состав полученных липосом. Полученные результаты свидетельствует о возможности значительно пролонгировать циркуляцию в кровотоке липосом встраиванием ПЭГ.

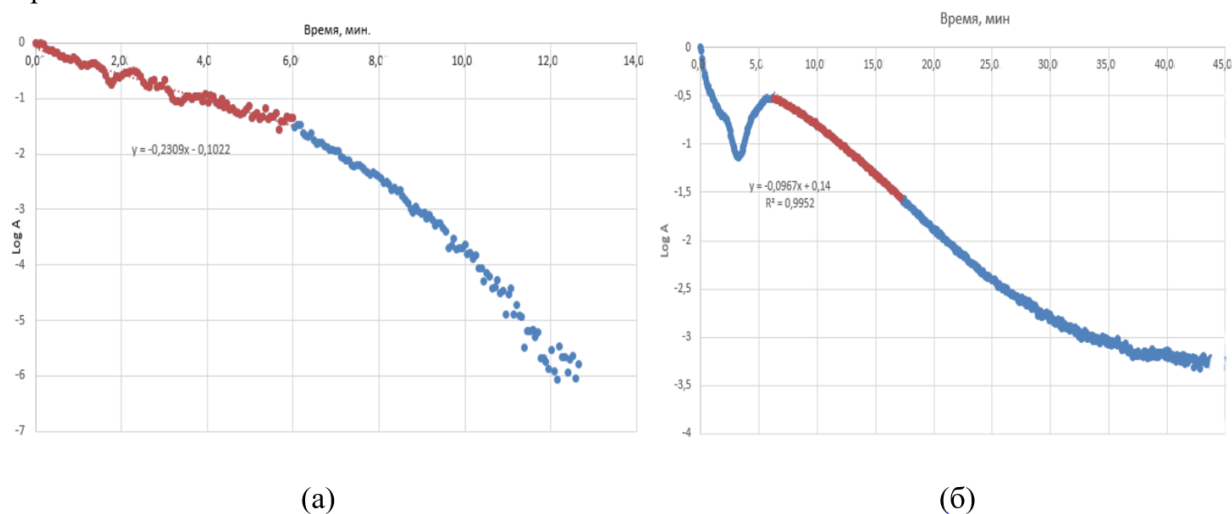


Рисунок 1. График изменения логарифма амплитуды магнитного сигнала со временем для: (а) магнитонаполненных не модифицированных ПЭГ липосом; (б) магнитонаполненных модифицированных ПЭГ липосом

Литература

1. Xie J., Lee S., Chen X. Nanoparticle-based theranostic agents // *Advanced Drug Delivery Reviews*. V. 62, 2010. P. 1064-1079
2. Charron D.M., Chen J., Zheng G. Theranostic Lipid Nanoparticles for Cancer Medicine // *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer*. 2015. P. 103–127.
3. Vlasova K.Y., Piroyan A., Le-Deygen I.M. et al. Magnetic liposome design for drug release systems responsive to super-low frequency alternating current magnetic field (AC MF) // *Journal of Colloid and Interface Science* V. 552, 2019, P. 689-700

УДК 612.82

Десинхронизация альфа и бета активности субталамического ядра при ипси- и контралатеральном движении у пациентов с болезнью Паркинсона

В.П. Мымрина^{1,2}, В.И. Филюшкина², А.С. Седов^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²ФГБУН ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

Болезнь Паркинсона (БП) - прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, связанное с нарушением работы базальных ганглиев и всей моторной системы головного мозга. Для хирургической терапии двигательных расстройств применяется глубинная стимуляция мозга (DBS) с помощью имплантированных электродов. Стимуляция субталамического ядра мозга или внутреннего бледного шара часто рекомендуется пациентам с БП. Эта процедура может модулировать гиперактивность в базальных ганглиях и уменьшать симптомы паркинсонизма и выраженность тремора. DBS также дает возможность регистрировать электрическую активность нейронов глубинных структур мозга для последующего многофакторного анализа.

Считается, что за движения одной половины тела отвечает противоположное (контралатеральное) полушарие, но в нескольких исследованиях с применением функциональной магнитно-резонансной томографии было замечено, что у пациентов с БП область активации распространяется и на ипсилатеральное полушарие [1]. В данном исследовании предлагается исследовать этот феномен у пациентов с БП на макроуровне с помощью регистрации локальных потенциалов нейронных популяций (LFP) в субталамическом ядре.

В рамках исследования было отобрано 5 пациентов с БП, которым проводилась нейрохирургическая операция по имплантации электродов глубокой стимуляции мозга с последующей экстернализацией. Пациенты выполняли двигательные тесты – многократно сжимали правую или левую руку в кулак. Регистрация электрической активности мышц сгибателей и разгибателей пальцев руки проводилась одновременно с 8-канальной регистрацией локальных потенциалов субталамического ядра.

Для анализа полученных данных была произведена фильтрация и удаление артефактов, а также спектральный анализ с удалением аperiодической компоненты в покое и при выполнении двигательных тестов. Непараметрический парный тест применялся для оценки различий мощности спектра в разных частотных диапазонах (тета, альфа, бета и гамма).

В ходе исследований были проанализированы локальные потенциалы субталамического ядра при сжатии правой или левой руки в кулак. Была выявлена закономерность, что при сжатии контралатеральной руки в кулак возникает значимая десинхронизация альфа ($p < 0.001$) и низкочастотных бета ритмов ($p < 0.001$), а также синхронизация гамма активности ($p < 0.001$). Эти результаты согласуются с ранее описанными исследованиями [2].

Мы показали, что сжатие ипсилатеральной руки в кулак также вызывало изменение активности субталамического ядра - десинхронизацию альфа ($p = 0.003$) и высокой бета активности ($p = 0.02$), а также синхронизацию низкой бета активности ($p = 0.006$) (рис. 1). При этом в отличие от движения контралатеральной рукой мы не наблюдали значимого изменения гамма активности. Значимых изменений активности в тета диапазоне при выполнении двигательных тестов мы не обнаружили.

Таким образом, мы показали билатеральную десинхронизацию альфа активности субталамического ядра при выполнении двигательных тестов у пациентов с болезнью Паркинсона. В отличие от предыдущих исследований мы не обнаружили билатеральных изменений бета и гамма активности [2]. Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении альфа осцилляции в

моторный контроль и функциональном различии с гипокинетической бета активностью. Этот феномен требует дальнейшего изучения с применением динамического спектрального анализа.

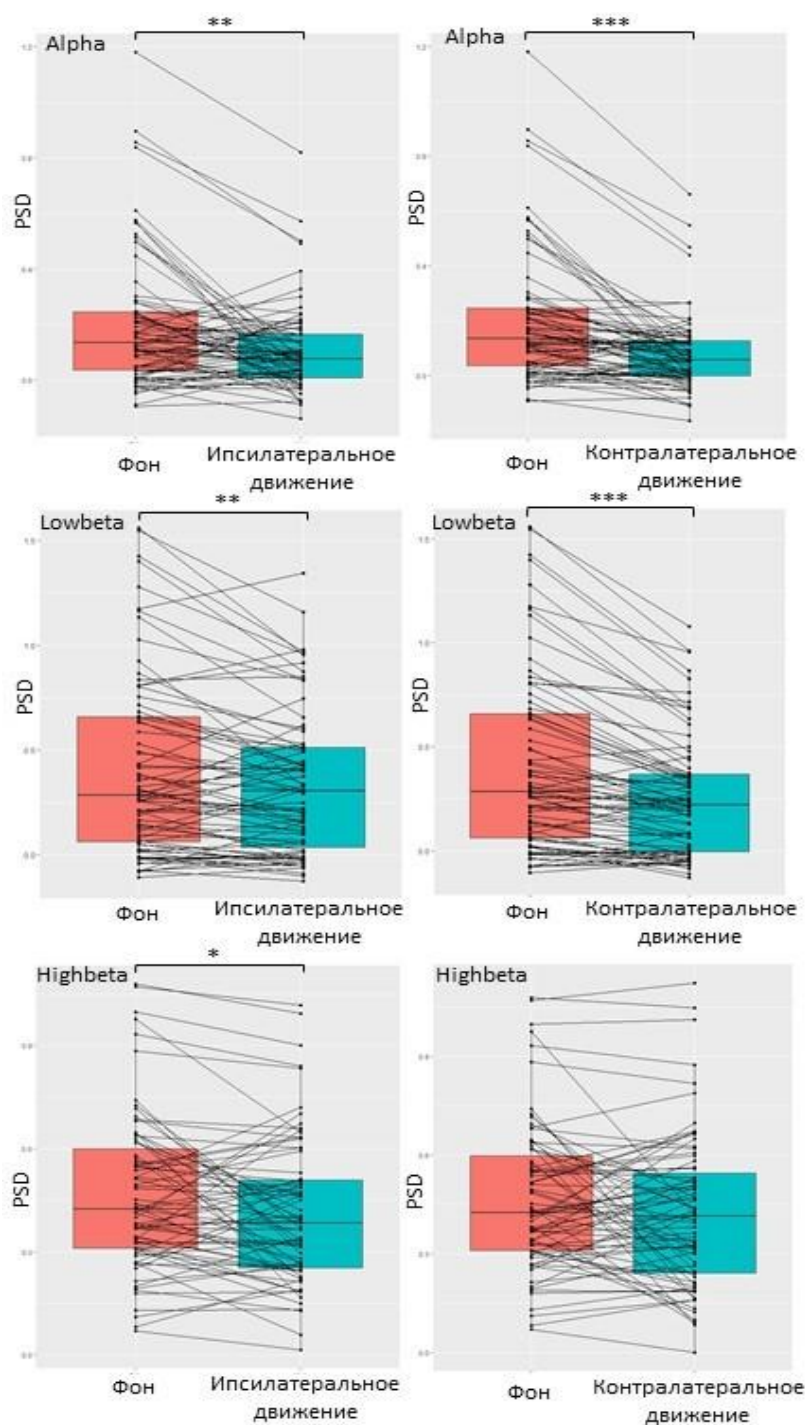


Рисунок 1. Спектральная плотность мощности (PSD) альфа, низкой и высокой диапазонов частоты при ипсилатеральном и контралатеральном движении по сравнению с отсутствием движения (фон)

Литература

1. Filyushkina V., Popov V., Medvednik R., Ushakov V., Batalov A., Tomskiy A., Pronin I., Sedov A. Hyperactivity of Basal Ganglia in Patients With Parkinson's Disease During Internally Guided Voluntary Movements // *Frontiers in neurology*. 2019. V. 10. P. 847.
2. Alegre M., Alonso-Frech F., Rodriguez-Oroz M.C., Guridi J., Zamarbide I., Valencia M., Manrique M., Obeso J. A., Artieda J. Movement-related changes in oscillatory activity in the human subthalamic nucleus: ipsilateral vs. contralateral movements // *The European journal of neuroscience*. 2005. V. 22(9). P. 2315–2324.

Исследование локальной гипертермии в карциноме на основе лазерного излучения

А.С. Золотарева, А.А. Первунецких

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Эффект тепловой линзы приводит к дополнительным искажениям выходного пучка лазера и уменьшению области охвата исследуемой опухоли. Соответственно, возникающая тепловая линза ухудшает качество излучения и усложняет работу врачей по удалению раковых опухолей. В работе были проведены серии экспериментов лазерной термотерапии на материалах, являющихся аналогами к нашей целевой части (ткани и жидкости человека): соевом соусе— а также непосредственно на исследуемых образцах надпочечников, содержащих раковые опухоли. Для решения проблемы, связанной с данным эффектом, нами была предложена методика компенсации объемных искажений, в основе которой лежит создание на компенсирующем устройстве профиля искажений, повторяющего профиль изображения в активном элементе, но с обратным знаком.

Для исследования свойств материала, являющегося аналогом основного материала, была изучена взаимосвязь между отдельными компонентами СПЭ, которые выражаются соотношениями [1]:

$$\sigma_s = \sigma_{s_lw} + \sigma_{ab} \quad (1)$$

$$\sigma_{ab} = \frac{2\sqrt{\sigma_{s_plus} \sigma_{s_minus}}}{2}, \quad (2)$$

$$\sigma_s = \sigma_{s_lw} + \frac{2\sqrt{\sigma_{s_plus} \sigma_{s_minus}}}{2} \quad (3)$$

$$\sigma_{s_lw} := \frac{1}{4} \cdot \sigma_{lw_prob} \cdot \left(1 + \cos\left(\theta_{prob} \cdot \frac{\pi}{180}\right) \right)^2 \quad (4)$$

$$\sigma_{s_minus} := \frac{\left[\left(\frac{1}{2} \cdot \sigma_{l_2} \right) \cdot \left(1 + \cos\left(\theta_2 \cdot \frac{\pi}{180}\right) \right) - \sqrt{\sigma_{s_lw} \cdot \sigma_{lw_l_2}} - \sqrt{\frac{\sigma_{m_l_2}}{\sigma_{m_l_1}} \cdot \left[\frac{1}{2} \cdot \sigma_{l_1} \cdot \left(1 + \cos\left(\theta_1 \cdot \frac{\pi}{180}\right) \right) - \sqrt{\sigma_{s_lw} \cdot \sigma_{lw_l_1}} \right]} \right]^2}{\sigma_{plus_l_2} - \sqrt{\frac{\sigma_{plus_l_1}}{\sigma_{m_l_2} \cdot \sigma_{m_l_1}}}} \quad (5)$$

$$\sigma_{s_plus} := \frac{\left[\frac{1}{2} \cdot \sigma_{l_1} \cdot \left(1 + \cos\left(\theta_1 \cdot \frac{\pi}{180}\right) \right) - \sqrt{\sigma_{s_lw} \cdot \sigma_{lw_l_1}} - \sqrt{\sigma_{s_minus} \cdot \sigma_{plus_l_1}} \right]^2}{\sigma_{m_l_1}}$$

(6)

здесь σ_s – удельная СПЭ твердого тела (для жидкостей σ – поверхностное натяжение), мДж/м²;
 lw – индекс физических неполярных (Лившиц-Ван-дер-Ваальсовых) компонентов СПЭ, мДж/м²;

θ – краевой угол смачивания поверхности твердого тела тестовой жидкостью, градус;

«prob» – индекс тестовой неполярной (инертной) жидкости дийодметан;

s и l – индексы принадлежности параметров к твердому телу и жидкости, соответственно;

1 и 2 – индексы принадлежности параметров двум полярным тестовым жидкостям: воде и формамиду, соответственно;

«minus» и «plus» – индексы Льюисовых основных и кислотных компонентов удельной СПЭ, соответственно.

$\sigma_{m_l_1}$ $\sigma_{plus_l_1}$ – основные и кислотные компоненты поверхностного натяжения тестовых жидкостей: l_1 (вода) и l_2 (формамид), мДж/м², соответственно.

Для удобства проведения этих расчетов нами была разработана программа (приложение) в среде Delphi на языке программирования ObjectPascal для операционной системы MS Windows, позволяющая осуществлять расчет свободной поверхностной энергии по методу Ван-Осс-Гуда (рис. 1).

Рассмотрен оптический отклик образца и контрольной среды в различных положениях вблизи фокуса линзы путем наблюдения за лазерным пятном на экране, расположенном в области дальнего поля [2].

(7)

$$T = \{T_0 + \frac{\delta I_0}{4\kappa} (R^2 - r^2), r \leq R, r > R\}$$

После проведения серии экспериментов на материалах, являющихся аналогами к нашей целевой части, была проведена часть непосредственно на исследуемых образцах надпочечников, содержащих раковые опухоли. Для лазерной термотерапии, в качестве источника нагревания ткани, был использован двухволновый п/п лазер с длинами волн в диапазонах: 630–690 и 810–1060 нм. Лазер генерирует излучение, распространяющееся по одному волоконно-оптическому кабелю (ВОК). При лазерной термотерапии осуществлялось нагревание опухоли до 45 °С, следствием чего являлось практически необратимое повреждение опухолевых клеток в результате белковой коагуляции. Область не охватывается полностью по причине возникновения эффекта тепловой линзы, который мы и наблюдали при исследовании вспомогательных материалов (рис.2). Для решения проблемы, связанной с данным эффектом, нами была предложена методика компенсации объемных искажений, в основе которой лежит создание на компенсирующем устройстве профиля искажений, повторяющего профиль изображения в активном элементе, но с обратным знаком. При таком подходе профили искажений взаимно компенсируются, и их влияние на параметры выходного излучения минимизируется (рис.1).

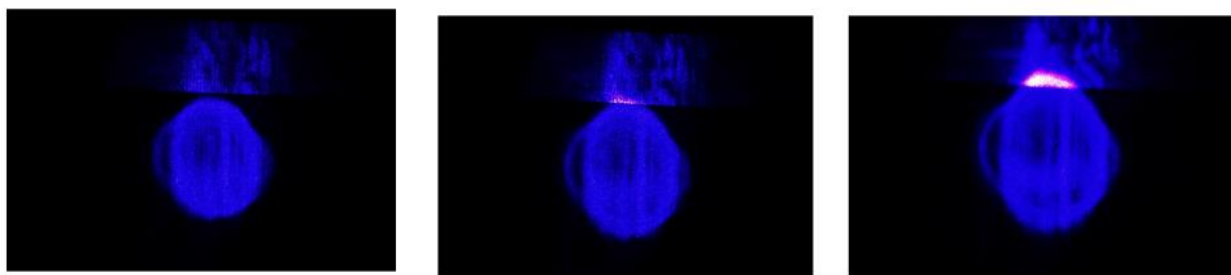


Рисунок 1. Сравнение расчетных данных с экспериментальными и интерфейс разработанной программы

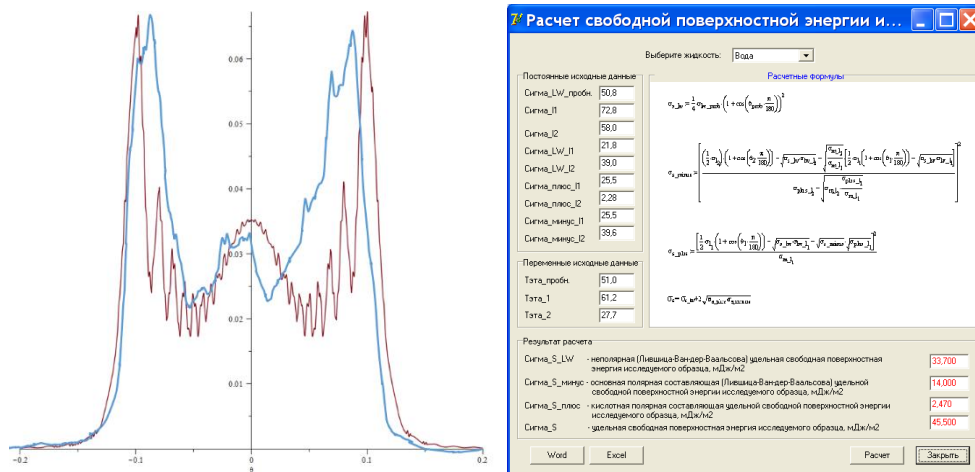


Рисунок 2. Охватываемая опухолевая область без эффекта тепловой линзы

Литература

1. Landsberg G.S. Optica. - 5-e izd. - 1976: Phymathlit, 2003. - 848 p..
2. Andreev N.E., Kuznetsov S.V. Laser Wakefield Acceleration of Finite Charge Electron Bunches // IEEE Trans. Plasma Sci. 2008. V. 36. P. 1765.