



МАТЕРИАЛЫ

IX МОЛОДЕЖНОЙ ШКОЛЫ-КОНФЕРЕНЦИИ
по молекулярной и клеточной биологии

Института цитологии РАН



ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ

РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

15-18 октября 2024

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Материалы
**IX Молодежной школы-
конференции по молекулярной
и клеточной биологии**
Института цитологии РАН
Санкт-Петербург, 15–18 октября 2024

Materials
**IX Youth School-Conference
on Molecular and Cellular Biology**
Institute of Cytology RAS
St. Petersburg, October 15–18, 2024

Санкт-Петербург
 **Астерион**
2024

УДК 576.3 : 576.08 : 576.5 DOI: 10.53115/9785001885320

Рецензенты:

Остроумова О.С., д.б.н., главный научный сотрудник
Лаборатории моделирования мембран и ионных каналов
Института цитологии РАНз

Боголюбов Д.С., д.б.н., главный научный сотрудник
Института цитологии РАН

**Материалы IX Молодежной школы-конференции
по молекулярной и клеточной биологии Института ци-
тологии РАН, С.-Петербург, 15–18 октября 2024 г. – СПб. :
Астерион, 2024. – 332 с. – DOI: 10.53115/9785001885320**

**Materials of the IX Youth School-Conference on
Molecular and Cellular Biology of the Institute of
Cytology of the Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, October 15–18, 2024.**

ISBN 978-5-00188-532-0

Сборник предназначен для студентов, аспирантов и
специалистов в области молекулярной и клеточной
биологии.

Издано при поддержке федерального государственного
бюджетного учреждения «Санкт-Петербургское
отделение Российской академии наук».

ISBN 978-5-00188-532-0

© Боголюбов Д.С., научное рецензирование, 2024

© Остроумова О.С., научное рецензирование, 2024

© Институт цитологии Российской академии наук, 2024

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ:

Председатель

ТОМИЛИН А.Н., член-корр. РАН

Заместитель председателя

ГУЖОВА И.В., д.б.н.

МИХАЙЛОВА Н.А., д.б.н

ОСТРОУМОВА О.С., д.б.н

БОГОЛЮБОВА И.О., д.б.н

ЛЮБЛИНСКАЯ О.Г., к.ф.-м.н.

БЕРДИЕВА М.А., к.б.н

ОРГКОМИТЕТ:

Председатель

МОРШНЕВА А.В.

Заместитель председателя

ГНЕННАЯ Ю.А.

АЛХАСАН Б.

БЕЛЯЕВА А.А.

ГНЕДИНА О.О.

ГУРЬЕВ Н.А.

ДУТЫШЕВА Е.А.

ЗЛОДЕЕВА П.Д.

КРАСКОВСКАЯ Н.А., к.б.н

КУНЕЕВ И.К.

ЛИТВИНОВ И.К.

ЛУКАЧЕВА А.В.

ЛЫСИКОВА Д.В.

МАРТЫНЮК В.А.

МАРЧЕНКО Д.М.

МИКЕЛАДЗЕ М.А.

НЕВЗОРОВ И.А.

ОВЧАРЕНКО Е.А.

ОГАНЕСЯН Е.А.

ПАЛИЙ О.С.

ПЕРЕПЛЕТЧИКОВА Д.А.

САФОНОВ П.Ю.

СЕМЕНОВ О.М.

СМИРНОВА Д.В.

УСАТЫХ А.А.

ФЕФИЛОВА Е.А.

ХАЙРУЛЛИНА З.М.

ЧАБИНА А.С.

ШЕКУНОВ Е.В., к.б.н.

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ:

ООО «Азимут Фотоникс»

ООО «БиоХимМак»

ООО «PhaseView»

ООО «NextGenSeq»

ООО «БМТ»

Фонд Генетических инноваций

ООО «Диаэм»

ООО «Профилаб»

Оглавление

Секция «Цитологические и молекулярно-биологические основы развития опухолей и методы противоопухолевой терапии».....	5
Секция «Физические основы жизни»	87
Секция «Генетические и омиксные технолог и в биологии и медицине»	123
Секция «Молекулярно-клеточные механизмы функционирования нервной системы в норме и при патологии»	165
Секция «Стволовые клетки и регенеративная биомедицина»	225
Секция «Микробиология и протистология»	289

Секция «Цитологические и молекулярно-биологические
основы развития опухолей и методы
противоопухолевой терапии»

ПИЛЛАР[5]АРЕНЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ СИСТЕМ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ ФТОРПИРИМИДИНОВ

Бродецкая М.А.^{*}, Шурпик Д.Н., Зеленихин П.В.

*Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань,
Россия*

E-mail: margaritabma02@gmail.com*

Химиотерапия, будучи высокоэффективной в лечении многих видов рака, имеет ряд существенных недостатков, начиная от тяжелых побочных эффектов и заканчивая серьезными системными нарушениями. Так, применение фторпиримидинов, третьих по популярности противоопухолевых агентов, существенно ограничено их высокой кардиотоксичностью. Решением данной проблемы могут стать системы таргетной доставки на основе пиллар[5]аренов, которые могут вследствие функционализации приобрести сродство к различным лигандам, опосредуя их стимулируемое высвобождение. Целью настоящей работы стал синтез деказамещенного остатками тиоглюкозы пиллар[5]арена, характеристика его способности связывать фторпиримидины и собственных цитотоксических свойств по отношению к клеткам аденокарциномы легкого человека A549 и клеткам эпителия лёгкого эмбрионов коровы LEK.

В работе впервые при помощи оригинальной синтетической методики получено водорастворимое деказамещенное остатками тиоглюкозы производное пиллар[5]арена с выходом более 60%. Методом электронной спектроскопии поглощения в УФ и видимой области спектра охарактеризована способность макроцикла взаимодействовать с рядом противоопухолевых агентов из группы фторпиримидинов: дакарбазином, тегафуром, 5-фторурацилом, флоксуридином в водных растворах. Установлено, что пиллар[5]арен связывался только с 5-фторурацилом в стехиометрическом соотношении 1:1. Вычисленный логарифм константы ассоциации составил $\lg K_{acc.1:1}=5.02$.

Впервые охарактеризованы цитотоксическое действие полученного макроцикла на клетки малигнизированного и нормального эпителия лёгких при помощи МТТ-теста. Установлено, что пиллар[5]арен обладал незначительной токсичностью, его IC₅₀ составила 600 и 700 мкМ, для клеток A549 и LEK, соответственно. Это делает данный макроцикл перспективной платформой для конструирования систем таргетной доставки 5-фторурацила. Полученные результаты обосновывают перспективность дальнейших исследований биологической активности комплексных препаратов на основе функционализированных пиллар[5]аренов и фторпиримидинов.

ОТКУДА БЕРЕТСЯ САРКОМА ЮИНГА?

Васильева Е.А. *, Аматавуда Д.Ф.

Детская больница Лос-Анджелеса, Университет Южной Калифорнии, Калифорния, США

E-mail: evasileva@chla.usc.edu, elenavasileva.sci@gmail.com*

Саркома Юинга — это злокачественная опухоль костей и мягких тканей с чрезвычайно плохим прогнозом для пациентов с метастатическим или рецидивирующим заболеванием. Саркома Юинга ассоциирована с появлением транслокации между 11-й и 22-й хромосомами (t (11;22) (q24;q12)), приводящей к синтезу онкогенного белка EWSR1-FLI1. Несмотря на значительный прогресс в изучении саркомы Юинга, механизмы трансформации клеток и причины прогрессирования опухолей остаются недостаточно глубоко изученными. Мы разработали новую генетическую модель саркомы Юинга интегрировав онкоген человека EWSR1-FLI1 в геном рыбок *Danio rerio*. Эта инвазивная модель позволяет изучать поведение раковых клеток, меченных GFP во время инициации и прогрессирования опухоли в сложном контексте развивающегося организма, что в настоящее время невозможно у млекопитающих. Используя нашу модель, мы охарактеризовали клетки, которые дают начало саркоме Юинга.

**ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
АНТИОКСИДАНТНЫХ СИСТЕМ ПРИ ОТВЕТЕ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА
ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС**

**Витковская Е.В.^{1,2*}, Иванова Ю.С.¹, Пуговкина Н.А.¹,
Люблинская О.Г.¹**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет,

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: rinettaj@gmail.com*

Поддержание окислительно-восстановительного баланса необходимо для обеспечения нормальной жизнедеятельности клетки. Среди систем, поддерживающих данный баланс, ключевыми являются тиоредоксин (TRX)- и глутатион (GSH)-зависимая ферментативные системы. Согласно литературным данным, опухолевые клетки обладают усиленной антиоксидантной защитой в сравнении с нормальными клетками. Однако недостаток фундаментальных знаний о работе данных систем затрудняет исследования по изучению их в качестве потенциальной мишени для противоопухолевой терапии.

Недавно разработанная в нашей лаборатории проточно-цитометрическая методика, дает возможность использовать биосенсор перекиси водорода HuPer для анализа функционирования антиоксидантных систем в клетке прижизненно. В данной работе, с помощью измерения динамики окисления белка HuPer была проведена количественная оценка активности антиоксидантной защиты клеток опухолевого фенотипа при ответе на H₂O₂ - индуцированный окислительный стресс различной интенсивности. В качестве клеточной модели была использована линия клеток хронической миелогенной лейкемии K-562, а в качестве меры антиоксидантной активности клеток – вычисляемая константа окисления биосенсора.

В первую очередь, мы показали, что при увеличении окислительной нагрузки пероксидазная активность в клетках линии K-562

снижается. Далее, используя ингибиторы ауранофин и бутионинсульфоксимин, мы изучили вклад TRX- и GSH-зависимой антиоксидантных систем, соответственно, в обеспечение элиминации внутриклеточной перекиси водорода. Было обнаружено, что TRX-система выполняет свою детоксифицирующую функцию только при низких окислительных нагрузках, сопоставимых с физиологическими концентрациями, измеряемыми в плазме крови. В то же время, активность GSH-системы сильно не зависит от интенсивности окислительного стресса, что может свидетельствовать в пользу обеспечения ею буферной антиоксидантной функции. Таким образом, данное исследование позволило провести комплексный анализ пероксидазной активности систем антиоксидантной защиты опухолевых клеток человека.

Работа поддержана грантом РФФ №21-74-20178.

**ТРАНСКРИПЦИЯ ПЕРИЦЕНТРОМЕРНОЙ ДНК
СЕМЕЙСТВА HS2/3 ПРИ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-
МЕЗЕНХИМНОМ ПЕРЕХОДЕ В КЛЕТКАХ A549,
ОБРАБОТАННЫХ ЦИСПЛАТИНОМ**

Волков В.В., Пономарцев Н.В. **, Енукашвили Н.И.*

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Email: n.enukashvily@incras.ru **

*ponomartsev@yandex.ru ***

Эпителиально-мезенхимный переход (ЭМП) – процесс изменения эпителиальными клетками своего фенотипа на мезенхимный в ходе эмбриогенеза, заживления раны, канцерогенеза. Оверэкспрессия ДНК перичентромерного сателлита 2/3 (HS2/3) человека вызывает увеличение уровня экспрессии маркеров ЭМП в клетках линии A549 (Ponomartsev et al., 2023). ЭМП является одним из механизмов устойчивости к цитостатикам, повреждающим ДНК. К таким препаратам относится цисплатин, используемый при терапии аденокарциномы легкого.

Цель работы: оценка количества мРНК HS2/3 и маркеров ЭМП в клетках линии A549, обработанных цисплатином.

Клетки обрабатывали цисплатином (6 мкг/л). Жизнеспособность клеток, а также уровень экспрессии HS2/3 и маркеров ЭМП оценивали: а) в течение суток после внесения препарата, б) через 7 суток. Количество живых и мертвых клеток оценивали с помощью счетчика клеток, экспрессию генов – методом количественной ПЦР. В качестве маркеров ЭМП были взяты *SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1* и маркеры мезенхимного фенотипа – *ACTA2*, *FNI*, *VIM*.

Цисплатин индуцировал ЭМП в клетках A549. В первые сутки наблюдался всплеск транскрипции маркеров ЭМП. В частности, количество мРНК *SNAI1* через 4 ч возрастало в $8,3 \pm 1,93$ раз по сравнению с необработанными клетками, через 8 ч – в $4,4 \pm 1,82$ раза, *SNAI2* через 4 ч – в $2,6 \pm 0,36$ раз, через 8 ч – в $26,9 \pm 3,66$ раза, *ACTA2* через 4 ч в $20 \pm 4,3$ раза, через 8 ч в $15 \pm 4,2$ раза. На 7 сутки при обработке цисплатином (6 мкг/л) уровень экспрессии *ACTA2* был повышен в $13 \pm 1,35$ раз, *VIM* в $2,4 \pm 0,26$, *SNAI1* в $3,3 \pm 0,83$ раза, *SNAI2* в $2 \pm 0,3$ раза. При этом признаков гибели клеток обнаружено не было. После удаления цисплатина из среды эпителиальная морфология клеток восстанавливалась.

Максимум транскрипции G и C-богатых участков HS2/3 выявлен через 4 и 8 часов. Всплеск транскрипции HS2/3 по времени совпадал со всплеском транскрипции генов-маркеров ЭМП в первые сутки.

Мы предполагаем, что экспрессия сателлитной ДНК может быть частью процесса ЭМП, способствующего формированию лекарственной резистентности опухолевых клеток.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования (Соглашение № 075- 15-2021-1075).

ОПУХОЛЕВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ MCF-7 И ПОИСК СПОСОБОВ ПОВЫШЕНИЯ ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ОБЛУЧЕНИЮ

Гутникова Д.О.^{1*}, Шуватова В.Г.², Шапошникова Д.А.²

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

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

E-mail: dashonokgutnikova@gmail.com*

Опухолевые стволовые клетки (ОСК) обладают способностью к асимметричному делению и обуславливают развитие опухолевого процесса (Eyler et al., 2008). Большое значение для ОСК имеют сигнальные каскады STAT3, Wnt, Notch, Hedgehog, NF-κB, PI3K/Akt/mTOR, которые вносят вклад в устойчивость этих клеток к действию ионизирующего излучения (Lee et al., 2017). Потенциальными радиосенсибилизаторами ОСК могут быть препараты, способные ингибировать сигнальные пути: никлозамид (Wnt), метформин (PI3K/AKT/mTOR и MEK/ERK1/2) и дазатиниб (с-Kit, PI3K) (Chen et al., 2009, Pollack et al., 2007, Neo et al., 2017). Целью работы была оценка влияния никлозамида, метформина и дазатиниба на радиочувствительность ОСК аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7.

Клетки линии MCF-7 культивировали в низкоадгезивных условиях в виде маммосфер, обогащенных ОСК.

За 1 ч до облучения в дозе 2 Гр (источник γ -излучения ^{60}Co) к клеткам добавляли никлозамид (2 мкмоль/л), метформин (250 мкмоль/л) или дазатиниб (2,5 мкмоль/л). После облучения клетки высаживали в плотности 1 клетка/мкл и культивировали в течение 7 сут, по истечении которых подсчитывали количество образовавшихся маммосфер с помощью световой микроскопии.

Количество маммосфер соответствует количеству ОСК в культуре (Ponti et al., 2005). Поэтому определение клоногенной активности может служить методом оценки влияния повреждающих факторов именно на ОСК. Препараты в субтоксических концентрациях

значимо не влияли на клоногенную активность. Действие γ -излучения в дозе 2 Гр приводило к уменьшению числа маммосфер в среднем на 20% относительно контроля. Добавление препаратов перед облучением значительно снижало клоногенную активность клеток маммосфер по сравнению с действием только излучения. Это снижение для никлозамида составило 23%, для метформина – 31% и для дазатинаба – 17%. Таким образом, все исследуемые препараты в субтоксической концентрации повышают чувствительность ОСК к действию γ -излучения. Радиосенсибилизирующий эффект препаратов может быть связан с ингибированием внутриклеточных каскадов, поддерживающих способность ОСК к репопуляции. Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

ФОРМИРОВАНИЕ ВЫСОКОАДГЕЗИВНОГО ФЕНОТИПА КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ КОЖИ В G₀ ФАЗЕ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Есимбекова А.Р. *, Рукша Т.Г.

*Красноярский государственный медицинский университет
имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Россия*

E-mail: aleksandra.esimbekova.96@mail.ru*

Низкая эффективность имеющихся на сегодняшний день противоопухолевых препаратов отчасти обусловлена появлением G₀-положительных опухолевых клеток в ответ на лекарственные средства, в связи с чем возникает необходимость поиска новых мишеней для лечения меланомы кожи.

Клеточные линии меланомы кожи SK-MEL-2 и A375 подвергали воздействию дакарбазина и вемурафениба в концентрации IC₅₀ и 2IC₅₀. Анализ клеточного цикла производился методами проточной цитометрии и иммуноцитохимии с маркером пролиферации Ki-67. Для определения доли стареющих клеток в общем пуле G₀ использовали цитохимический метод, основанный на активности

лизосомальной β -галактазидазы. Изменение транскриптомного профиля оценивали методом микрочипирования. Согласно результатам биоинформатического анализа дальнейшее исследование было сосредоточено на адгезивной способности G_0 -положительных клеток на основе их устойчивости к воздействию центробежной силы и колориметрического анализа с компонентами внеклеточного матрикса.

Обнаружена способность цитостатического препарата дакарбазин и таргетного препарата вемурафениб индуцировать повышение доли клеток в G_0 фазе клеточного цикла, зарегистрированная методом проточной цитометрии и иммуноцитохимического анализа. Согласно результатам цитохимического исследования, вемурафениб индуцировал старение G_0 -положительных клеток меланомы, тогда как под действием дакарбазина наблюдалось слабое увеличение доли стареющих клеток, с преобладанием дормантной популяции клеток. Индуцированное дакарбазином повышение доли клеток в G_0 фазе сопровождалось изменением экспрессии генов, которые участвуют в регуляции клеточного цикла, ангиогенеза и фокальной адгезии. G_0 -положительные клетки характеризовались повышением адгезивной способности в эксперименте с воздействием центробежной силы, а также повышенным взаимодействием с фибронектином. Усиленная адгезия опухолевых клеток в фазе G_0 к внеклеточному матриксу может служить перспективной мишенью для разработки новых противоопухолевых препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 19-15-00110).

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ГИПОКСИИ И СПОСОБНОСТЬ К ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ КЛЕТОК УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ

Жильникова М.В.^{1,2*}, Зверева С.П.¹

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

*² Новосибирский государственный университет, Новосибирск,
Россия*

E-mail: m.zhilnikova@g.nsu.ru*

Для роста и метастазирования опухоли критически важным является прораствание новых кровеносных сосудов, которое стимулируется условиями гипоксии. Кроме того, наиболее инвазивные опухолевые клетки способны формировать сосудоподобные структуры для получения кислорода и метастазирования независимо от истинных кровеносных сосудов. Такое явление называется васкулогенной мимикрией и наряду с опухолевым ангиогенезом рассматривается как перспективная мишень в противоопухолевой терапии для препятствования распространению опухолевых клеток по организму.

В данной работе исследовали ответ на гипоксию и способность к васкулогенной мимикрии клеток первичных культур увеальной меланомы (УМ) человека, выделенных из операционного материала. Для выявления влияния гипоксии на уровень ключевого регулятора ангиогенеза, VEGF, клетки УМ культивировали в режиме «импульсной гипоксии», чередуя условия нормального и сниженного уровня кислорода. Такие колебания уровня кислорода являются естественными для опухолевых клеток при разрастании опухоли и недостатке кровоснабжения, и в результате было показано увеличение уровня VEGF в культуральной среде клеток УМ в 2-4 раза.

VEGF способен не только стимулировать ангиогенез, но и повышать пролиферацию и инвазивные свойства опухолевых меланоцитов. Было установлено, что более половины клеток в первичных

культурах УМ несут на своей поверхности один из рецепторов VEGF, VEGFR2.

Гипоксия и, как следствие, возрастание уровня VEGF приводят к повышению экспрессии гена VE-кадгерина в онкотрансформированных меланоцитах. VE-кадгерин считается ключевой молекулой адгезии, вовлеченной в васкулогенную мимикрию, поэтому был определен его уровень на поверхности клеток УМ. Для исследования способности клеток УМ формировать сосудоподобные структуры клетки УМ культивировали в матриксе Matrigel®.

Таким образом, в ходе работы была оценена способность клеток первичных культур УМ к стимулированию роста сосудов, васкулогенной мимикрии и, следовательно, их метастатический потенциал. Как итог, были выявлены мишени для тестирования на клетках УМ таргетных противоопухолевых препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 23-14-00285).

**ПОИСК МАРКЕРОВ *OPISTHORCHIS FELINEUS*
АССОЦИИРОВАННОЙ ХОЛАНГИОКАРЦИНОМЫ В
ОБРАЗЦАХ ОПУХОЛИ КЛАЦКИНА**

**Запарина О. *, Ковнер А.В., Минькова Г.А.,
Пахарукова М.Ю.**

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

E-mail: zp.oksana.93@gmail.ru*

Описторхоз при инфекции кошачьей двуустки *Opisthorchis felineus* вызывает неоплазию эпителия желчных протоков. Близкородственные виды *O. viverrini* и *Clonorchis sinensis* признаны биологическими канцерогенами I А класса и основными факторами риска развития холангиокарциномы. В виду отсутствия систематических эпидемиологических исследований и адекватных клеточных моделей, канцерогенный потенциал *O. felineus* изучен недостаточно. Исследований, достоверно подтверждающих

взаимосвязь описторхоза, вызванного *O. felineus* и холангиокарциномы, в том числе опухоль Клацкина (воротная холангиокарцинома) у людей, также не проводилось. Цель данной работы: охарактеризовать клеточную линию, полученную из холангиокарциномы, ассоциированной с *O. felineus* и выявить аналогичные канцерогенные маркеры в опухоли Клацкина у пациентов из региона, эндемичного по описторхозу.

Клеточная линия ССА-OF была получена на сирийских хомячках *Mesocricetus auratus* при сочетании инфекции трематодами *O. felineus* и слабых доз диметилнитрозоамина. Клетки были анеуплоидны и имели морфологические особенности эпителиоподобных клеток. Полученная клеточная линия пригодна для аллотрансплантации. С помощью иммуноцитохимического, иммуногистохимического окрашиваний и ПЦР в режиме реального времени было установлено, что клетки линии ССА-OF, также, как и аллотрансплантанты, экспрессировали следующие маркеры: цитокератин 7, аннексин А1, экзостосин 1 и виментин. Экспрессию выбранных маркеров исследовали на аутопсийных образцах от 8 пациентов с опухолями Клацкина.

В целом наши результаты позволяют предположить, что клеточная линия ССА-OF является подходящей моделью для исследований *in vivo*, *in vitro* и *ex vivo* общих и видоспецифичных механизмов холангиокарциногенеза, ассоциированного с инфекцией *O. felineus*, для поиска биомаркеров и для испытаний противораковых препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-25-00080).

ВЛИЯНИЕ ДЕПРИВАЦИИ ГЛУТАМИНА НА КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ

Исакова А.А.^{1,3*}, Дружкова И.Н.², Мазур Д.В.¹ Антипова Н.В.¹,
Гаспарян М.Э.¹, Яголович А.В.³

¹ *Институт биоорганической химии им. академиков М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;*

² *Приволжский исследовательский медицинский университет,
Нижний Новгород, Россия;*

³ *Московский государственный университет им. М.В.
Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: alina.labbio@gmail.com*

Глутамин является одной из ключевых аминокислот в метаболизме опухолей. В солидных опухолях наблюдается локальная депривация глутамина, что делает его потенциальной мишенью для терапии. В работе исследовали влияние депривации глутамина на клетки глиобластомы U87MG. В отсутствие глутамина снижалась скорость роста клеток и повышалась экспрессия ингибиторов циклин-зависимых киназ p21^{Waf1} и p27^{KIP1}. Однако, при этом не наблюдалось окрашивания клеток на β-галактозидазу, что в совокупности может указывать на переход клеток в состояние дормантности, но не сенесцентности. Также была повышена экспрессия маркера стволовости CD133, что может указывать на процесс дедифференциации. Метаболический имиджинг на основе двухфотонной флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (FLIM) по автофлуоресценции НАДН показал сдвиг метаболизма в сторону гликолиза. Это подтверждалось увеличением продукции лактата клетками, культивируемыми в среде без глутамина. Кроме того, наблюдалось повышение экспрессии компонентов сигнального пути цитокина TRAIL, рецептора DR5 и антиапоптотического гомолога каспазы-8 cFLIP, что сопровождалось повышением чувствительности клеток к DR5-опосредованной клеточной гибели. Поскольку сигнальный путь TRAIL играет важную роль в иммунном надзоре за опухолевыми клетками, наши данные подтверждают, что метаболизм глутамина

может модулировать опухолевый иммунный ответ. Однако при этом депривация глутамина приводила к устойчивости клеток U87MG к ингибированию фермента NAMPT, лимитирующего биосинтез NAD, что коррелирует со сдвигом метаболизма в сторону гликолиза. Таким образом, депривация глутамина вызывала дормантное состояние и контрастные ответы на терапевтические воздействия в клетках глиобластомы U87MG. Эти данные следует учитывать при разработке стратегий лечения глиобластомы путем лекарственной депривации аминокислот, а также при исследовании новых потенциальных терапевтических мишеней.

Исследование выполнено за счет гранта РФФ №24-24-00222.

**БИЛИАРНАЯ НЕОПЛАЗИЯ СОПРОВОЖДАЕТСЯ
АКТИВАЦИЕЙ АНГИОГЕНЕЗА В ПЕЧЕНИ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ ТРЕМАТОДОЙ
*OPISTHORCHIS FELINEUS***

Капушак Я. К.*, Ковнер А.В.

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

E-mail: YarikKaps@yandex.ru*

Описторхоз – это заболевание, вызываемое паразитированием *Opisthorchis felineus* (OF) в желчных протоках рыбоядных млекопитающих. Заражение происходит при употреблении в пищу рыбы семейства карповых. Заболевание характеризуется развитием неоплазии эпителия желчных протоков и перидуктального фиброза печени. Активация фиброобразования печени и неоангиогенеза, как ключевой фактор развития опухоли, ранее была описана при шистосомозе. Цель исследования заключалась в оценке уровня новообразованных сосудов, фиброза и неоплазии в печени Сирийских хомячков, зараженных OF в динамике.

Метацеркарии были выделены из рыб семейства карповых, выловленных в Оби. Сирийских хомячков заражали 75-метацеркариями OF через зонд. Забор печени осуществлялся через 1–18 месяцев. Уровень неоплазии оценивали при окраске

гематоксилин-эозином, фиброз выявляли окрашиванием по Массону, амилоидоз – с помощью окраски Конго-Ред. Для оценки уровня новообразованных и уже имеющихся сосудов проводили иммуногистохимическое окрашивание маркеров CD34 и CD31 и оценку экспрессии генов *Cd34* и *Cd31*.

Уровень неоплазии эпителия желчных протоков превышал контрольное значение, начиная с 3-го месяца, и увеличивался в динамике. Общее количество сосудов (CD31+), увеличивалось с 6-го месяца инфекции и достигало максимума к 18-му месяцу. При окрашивании Конго – Ред нами было обнаружено отложение амилоида в стенках артериол. Количество амилоида также с 6-го месяца достоверно превышало контрольное значение.

При заражении OF количество новообразованных CD34+ сосудов увеличивалось с 1-го месяца. С 1-го по 9-ый месяц выделяется положительный тренд ($P < 0.001$), однако далее наблюдается снижение количества CD34+ сосудов к 18-му месяцу ($P < 0.017$). Тем не менее, количество новообразованных сосудов не снижалось до контрольного уровня. С помощью RT-PCR была осуществлена оценка экспрессии двух генов, *Cd31* и *Cd34*. Уровни экспрессии обоих генов увеличивались к третьему месяцу, а затем незначительно колебались в динамике.

Таким образом неоангиогенез и фиброз являются тесно взаимосвязанным процессами и сопровождают развитие неоплазии эпителия желчных протоков.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№24-44-00048).

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ
НА МЕТАБОЛИЗМ МИТОХОНДРИЙ
В ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГАХ:
ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ**

**Каримова А. Ф.^{1*}, Марков Н.И.², Суезов Р.В.³, Мухамедшина
Я.О.¹, Гомзикова М.О. ¹, Ризванов А.А.¹, Барлев Н.А.^{1,4}, Симон
Х-У.^{1,2}, Бричкина А.И.^{1,3}**

¹ *Институт фундаментальной медицины и биологии
Казанского федерального университета, Казань, Россия;*

² *Институт фармакологии Бернского университета, Берн,
Швейцария;*

³ *Институт Системной Иммунологии, Марбургский
университет имени Филиппа, Марбург, Германия*

⁴ *Кафедра биомедицинских наук, Медицинский факультет,
Назарбаев Университет, Астана, Казахстан*

Email: mullahmetovaadela@gmail.com*

Опухоль-ассоциированные макрофаги (ОАМ) являются основным компонентом микроокружения опухоли и играют значительную роль в прогрессировании рака и его невосприимчивости к терапии. Инфильтрация моноцитов и их дифференцировка в макрофаги в очаге опухолеобразования происходит на ранних этапах развития рака. В зависимости от профиля секреторных факторов в опухолевом микроокружении, макрофаги поляризуются либо в подтип М1, уничтожающие раковые клетки и запускающие противоопухолевый иммунный ответ, либо в подтип М2, поддерживающие опухолевый рост. Протуморогенные функции ОАМ требуют массивных метаболических перестроек. Макрофаги М1 переключают свой метаболизм на гликолиз, в то же время макрофаги М2 поддерживают высокие уровни окислительного фосфорилирования. Таким образом, фармацевтические соединения, подавляющие митохондриальное дыхание ОАМ и переключющие метаболизм на гликолиз, могут быть хорошими кандидатами для лечения онкологических заболеваний.

Мы выбрали несколько фармацевтических соединений: диданозин, ротенон, олигомицин, FCCP, MYLS22 и ИМТ1В. Мы протестировали эти соединения на мышинных макрофагах, макрофагах, дифференцированных из периферической крови здоровых доноров, и клеточной линии THP1. Мы использовали клетки рака легкого мыши с мутациями Kras^{G12D}/p53^{-/-} и линию рака легкого человека A549. Мы протестировали влияние фармакологических соединений на физиологию макрофагов.

Выбранные фармацевтические соединения эффективно ингибировали способность ОАМ стимулировать рост опухолевых клеток. Этот процесс зависел как от прямого межклеточного контакта с опухолевыми клетками, так и от секреторных факторов, продуцируемых ОАМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства РФ № 075-15-2021-600. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030».

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ, ЛЕЖАЩИХ В ОСНОВЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА SLURP-1

**Киселева Е.А.^{1*}, Бычков М.Л.¹, Шлепова О.В.^{1,2}, Кирпичников
М.П.^{1,4}, Люкманова Е.Н.^{1,2,3,4**}**

¹ *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия*

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

³ *Шэньчжэньский МГУ-ППИ Университет, Шэньчжэнь, Китай*

⁴ *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: *eugeniakis2002@gmail.com,*

***ekaterina-lyukmanova@yandex.ru*

Одним из наиболее распространенных про-онкогенных рецепторов является рецептор эпидермального фактора роста (EGFR),

гиперэкспрессия и гиперактивация которого характерны для многих опухолей. Кроме того, существует мутантный вариант EGFRvIII, который не способен связывать EGF и опосредует устойчивость опухолевых клеток к ингибиторам EGFR. SLURP-1, антагонист никотиновых ацетилхолиновых рецепторов $\alpha 7$ типа ($\alpha 7$ -nAChR), экспрессируется клетками эпителия, регулирует гомеостаз эпителия и защищает клетки от злокачественной трансформации. Недавно было показано, что SLURP-1 связывается с EGFR, однако молекулярные механизмы этого взаимодействия не изучены.

В данной работе с помощью метода аффинной экстракции было выявлено негативное влияние мутации R74A на взаимодействие SLURP-1 с EGFR и EGFRvIII, что указывает на расположение эпитопа взаимодействия белка с этими рецепторами. Поскольку EGFRvIII содержит усеченные I и II субдомены, сайт связывания SLURP-1 с рецепторами лежит в области III и IV субдоменов, что также доказывают константы связывания, определенные методом проточной цитометрии.

Методом «in-cell ELISA» было показано, что связывание SLURP-1 с EGFR снижает фосфорилирование по Y1173, в то время как мутация R74A усиливает EGF-индуцированную активацию рецептора. Это может говорить о том, что SLURP-1 не только прямо взаимодействует с EGFR, но и опосредованно, например, через комплекс $\alpha 7$ -nAChR/EGFR, образующийся в эпителиальных клетках.

SLURP-1, в силу низкой токсичности и иммуногенности, – перспективная основа для создания новых противоопухолевых препаратов, направленных на регуляцию активности EGFR.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 23-74-00040).

**СКРИНИНГ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ, ИНГИБИРУЮЩИХ ОНКО-
АССОЦИИРОВАННЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ
В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО**

Кирдеева Ю.Н.* , Дакс А.А., Барлев Н.А., Шувалов О.Ю.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Email: yulia.kirdeeva@yandex.ru*

Введение: В последнее время тема применения лекарственных грибов в терапии неоплазий набирает актуальность, поскольку природные соединения играют важнейшую роль в разработке новых химиопрепаратов. В клинической практике Китая и Японии используются такие лекарственных грибы как шиитаке (*Lentinula edodes*), рейши (*Ganoderma lucidum*), трутовик разноцветный (*Trametes versicolor*) и ежовик гребенчатый (*Hericium erinaceus*). Согласно литературным данным, противоопухолевые свойства этих лекарственных грибов объясняются присутствием в них полисахаридов и низкомолекулярных веществ, прежде всего фенолов и терпеноидов. При этом молекулярные механизмы, опосредующие противоопухолевые эффекты этих соединений, остаются мало изученными.

Цель исследования: Скрининг и изучение противоопухолевых свойств различных низкомолекулярных соединений из лекарственных грибов в клеточных моделях немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) человека.

Материалы и методы: По литературным данным нами были отобраны низкомолекулярные соединения, выделенные из лекарственных грибов: ганодеровая кислота, гиспидин, траметоноловая кислота, гисполон, кордицепин и инотодиол. По результатам скрининга (мтТ анализ) нами были отобраны вещества, проявившие наибольшую ингибирующую активность по отношению к клеточным моделям НМРЛ (А549, Н1299, Н460): гисполон, кордицепин и траметоноловая кислота. Далее мы исследовали влияние данных соединений на апоптоз, клеточный цикл, мембранный потенциал митохондрий и энергетический

метаболизм опухолевых клеток (иммуноблоттинг, ПЦР в РВ, проточная цитометрия, технология «SeaHorse»).

Результаты: Гисполон, кордицепин и траметоноловая кислота проявили наиболее выраженное ингибирующее действие на опухолевые клетки. Также было показано, что кордицепин и гисполон снижали мембранный потенциал митохондрий и энергетический метаболизм, а также вызывали арест клеточного цикла. Гисполон индуцировал апоптоз клеточных моделей НМРЛ. Кроме того, кордицепин и гисполон подавляли экспрессию ферментов гликолиза, одноуглеродного метаболизма, метаболизма жирных кислот, а также ингибировали PI3K/AKT/mTOR сигнальный путь.

Выводы: Показано ингибирующее влияние гисполона и кордицепина на онко-ассоциированные метаболические процессы в клеточных моделях НМРЛ человека.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 24-45-04002.

**DUPA7, НЕФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ХИМЕРНЫЙ ВАРИАНТ
A7-NACHR, ОПОСРЕДУЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК
МЕЛАНОМЫ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОМУ БЕЛКУ
SLURP-1**

**Кириченко А.В.^{1,2}, Бычков М.Л.², Кульбацкий Д.С.²,
Шулепко М.А.³, Шлепова О.В.^{1,2}, Михайлова И.Н.⁴, Медяник
И.А.⁵, Кирпичников М.П.^{2,6}, Люкманова Е.Н.^{2,3,6*}**

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

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

³ *Биологический факультет, Шеньчжэньский МГУ-ППИ
⁴ Университет, Шэньчжэнь, Китай*

⁵ *Национальный медицинский исследовательский центр
онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, Россия*

⁶ *Приволжский исследовательский медицинский университет,
Нижний Новгород, Россия*

E-mail: lyukmanova_ekaterina@smbu.edu.cn*

Меланома – агрессивная опухоль, прогрессия которой сопровождается снижением экспрессии трехпетельного белка SLURP-1 семейства Ly6/uPAR (Bergqvist et al., 2018). Данный белок регулирует гомеостаз эпителия путем аллостерического ингибирования никотиновых ацетилхолиновых рецепторов типа альфа 7 ($\alpha 7$ -nAChR) (Lyukmanova et al., 2016). В данной работе была изучена применимость восполнения дефицита SLURP-1 рекомбинантным аналогом (rSLURP-1) для контроля гомеостаза клеток меланомы. Мы показали, что количество эндогенного SLURP-1 в плазме пациентов с меланомой снижено по сравнению со здоровыми донорами. rSLURP-1 ингибировал миграцию клеток, полученных от пациентов с метастатической меланомой, посредством $\alpha 7$ -nAChR. При этом клетки меланомы, устойчивые к rSLURP-1, обладали более высоким уровнем экспрессии химерного нефункционального варианта $\alpha 7$ -nAChR, называемого dup $\alpha 7$ (Di

Lascio et al., 2022). Снижение экспрессии *dupa7* в клетках, устойчивых к rSLURP-1, вызывала чувствительность к белку, тогда как увеличение экспрессии *dupa7* в чувствительных клетках превращало их в резистентные. rSLURP-1 не связывался с *dupa7* и не действовал на рецепторы, образующиеся при совместной экспрессии *dupa7* с $\alpha 7$ -nAChR в ооцитах *Xenopus laevis*. Мы предполагаем, что небольшое количество сайтов связывания SLURP-1 и *dupa7* не влияет на взаимодействие и функцию rSLURP-1 в клетках меланомы, но повышение уровня *dupa7* вызывает более явное уменьшение сайтов взаимодействия рецептора с rSLURP-1 и приводит к потере чувствительности клеток к модулятору. Таким образом, наши результаты показывают, что таргетирование $\alpha 7$ -nAChR с помощью rSLURP-1 может быть многообещающей стратегией терапии меланом и указывает на важную роль *dupa7* в регуляции холинергической системы в раковых клетках. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект №23-74-00040).

ВЛИЯНИЕ АКРИДОНУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВАЦИЮ STING ЗАВИСИМОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ

Кorableва П.Е.^{1*}, Невзоров И.А.¹, Дакс А.А.¹, Барлев Н.А.^{1,2}

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Назарбаев Университет, Астана, Казахстан*

E-mail: korablevapolina936@gmail.com*

Стимулятор генов интерферонов (STING) представляет собой сигнальный белок, который играет важную роль во врожденном иммунитете - он индуцирует выработку интерферонов при попадании в клетку чужеродной ДНК. В ряде исследований было показано, что STING также может принимать участие в регуляции апоптоза (Zheng et al, 2023) и клеточного цикла (Long et al, 2022). Именно поэтому активация белка STING его агонистами является перспективным подходом в иммунотерапии рака.

Известно, что акридонуксусная кислота (СМА) является агонистом STING и может вызывать продукцию интерферонов в макрофагах мыши. Под действием СМА белок STING отсоединяется от эндоплазматического ретикулума и запускает TBK1/IRF3-путь, в результате работы которого транскрипционный фактор IRF3 фосфорилируется, что приводит к увеличению экспрессии интерферонов первого типа. Более того, известно, что СМА может вызывать STING-опосредованный апоптоз в Т-клетках мышей, однако такой эффект от активации данного пути зависит от содержания и активности STING в данном типе клеток. При активации STING-опосредованного апоптоза в Т-клетках мышей индуцируется ряд проапоптотических генов, таких как *Noxa*, *Puma*, *Bim* и *Bad*. Белки, кодируемые данными генами, выполняют свою проапоптотическую функцию путём нейтрализации антиапоптотических белков семейства Bcl2.

Целью данной работы была оценка влияния СМА на STING-путь в опухолевых клетках человека. Также было оценено влияние СМА на некоторые проапоптотические и антиапоптотические белки.

Выбор генов-мишеней для анализа осуществлялся на основе литературных данных - была оценена активация участников STING-каскада, а также ряда проапоптотических и антиапоптотических генов. Исследования проводились на линиях немелкоклеточного рака легкого и хронической миелогенной лейкемии (H1299 и K562, соответственно). Клетки инкубировались в присутствии СМА с концентрацией 125 мкг/мл и 250 мкг/мл на протяжении двух, четырех или шестнадцати часов. Оценка активации проводилась при помощи методов вестерн-блот и ПЦР в реальном времени.

Полученные данные позволяют нам оценить влияние СМА на активацию STING-пути и экспрессию ряда проапоптотических и антиапоптотических генов.

**ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ 2-
ХЛОРФАСКАПЛИЗИНА В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК
ЛЕЙКОЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

**Кренгауз М.Д.^{1,2*}, Ведерникова В.О.^{1,2}, Тряпкин О.А.³,
Смирнова П.А.³, Прасолов В.С.¹, Спирин П.В.^{1,2}**

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

² *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
РАН, Москва, Россия*

³ *Дальневосточный федеральный университет, Владивосток,
Россия*

E-mail: krengauz.md@phystech.edu*

Лейкозы - группа злокачественных заболеваний крови, возникающих в костном мозге в результате мутаций в геноме гемопоэтических клеток. Из-за этого нарушается баланс активности сигнальных путей, регулирующих рост клеток, чувствительность к сигналам апоптоза и дифференцировку. В результате пул аномальных клеток вытесняет нормальные ростки кроветворения. Для лечения лейкозов применяют курсы химиотерапии, но данный подход не всегда является эффективным и может приводить к развитию устойчивых форм заболевания. Актуальными задачами биомедицины являются поиск и введение в лечебную практику новых эффективных препаратов. Фаскаплизин – соединение, выделенное из морских губок рода *Fascaplysinopsis*. Данная работа посвящена исследованию противораковой активности нового производного фаскаплизина – 2-хлорфаскаплизина. В результате была установлена чувствительность клеток лейкозов к препарату и показано, что он проявляет цитотоксический эффект в отношении злокачественных клеток. Показано, что соединение замедляет прохождение G2 фазы клеточного цикла, индуцирует апоптоз, влияет на экспрессию генов, кодирующих белки, отвечающие за выживание клеток, в частности Bcl-2, Bcl-xL, Циклин A1, Циклин B1, p21, p53. Оценена чувствительность клеток к данному препарату при его совместном применении с известными

химиотерапевтическими средствами: палбоциклибом, доксорубицином, ингибиторами протеасом.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, грант №23-64-10018.

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ РЕЦИДИВА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ПОСЛЕ ХИМИОТЕРАПИИ

**Кузнецова Л.С.* , Моршнева А.В., Маргулис Б.А., Гужова И.В.,
Лазарев В.Ф.**

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: lyubakuznetsov@gmail.com*

Рецидив опухолевого роста является одним из основных препятствий к успешной терапии рака. Его возникновение становится возможным благодаря взаимодействию двух факторов. С одной стороны, опухоль является гетерогенным образованием, вследствие чего некоторые клетки оказываются более резистентными к терапии. С другой стороны, массовая клеточная гибель в ответ на терапию способна дополнительно стимулировать повторную прогрессию выживших клеток. Известно, что высвобождаемые при клеточной гибели факторы способны стимулировать процессы пролиферации, инвазии, миграции, а также активацию в выживших клетках программы аутофагии.

Ранее нами была создана животная модель рецидива колоректального рака, основанная на взаимодействии выживающих (акцепторных, АК) погибающих (питающих, ПК) в ходе химиотерапии клеток. Мы показали, что ПК стимулируют туморегенез колоректального рака мыши *in vivo*. Целью данной работы стал перенос полученной нами модели на человеческие клетки колоректального рака НСТ-116. Первым этапом работы стало создание клеточных линий с флуоресцентной меткой (НСТ-116-Kat2S) или люминесцентной меткой (НСТ-116-luc и НСТ-116/ox-luc) с помощью лентивирусной трансдукции. При этом в данной работе в качестве АК выступали как чувствительные клетки (НСТ-116-luc), так и резистентные клетки к оксалиплатину клетки (НСТ-116/ox-

luc). Мы показали, что ПК (HCT-116-Kat2S) предварительно обработанные оксалиплатином, вызывают изменение пролиферации у обоих типов АК. У чувствительных АК происходило снижение пролиферации, в то время как у резистентных АК наоборот происходило ее усиление. Далее мы показали, что сокультивация с ПК индуцирует повышение экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода в обоих типах АК, что свидетельствует о приобретении клетками более агрессивного фенотипа. Также в ходе данной работы мы апробировали методику ортотопического введения клеток HCT-116-luc. Полученные опухоли были способны к спонтанному метастазированию, что было подтверждено методом количественной ПЦР. Таким образом, мы получили данные, позволяющие сформировать каркас для релевантной модели рецидива колоректального рака человека после химиотерапии *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и Высшего образования РФ (проект № 19-74-20161).

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ КАК МЕХАНИЗМ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

Лапкина Е.З.* , Рукша Т.Г.

*Красноярский государственный медицинский университет
имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства
здравоохранения, Красноярск, Россия
E-mail*: e.z.lapkina@mail.ru*

В настоящем эксперименте на клетки меланомы линии В16 воздействовали дакарбазином для изучения распределения клеток по фазам клеточного цикла и способности переходить в фазу G0. Осуществляли выделение фракции G0-положительных клеток меланомы методом клеточного сортирования и последующее определение уровней циклинзависимой киназы CDK4 и ингибитора циклинзависимой киназы В1 в данных клетках.

В *in vivo* исследовании мышинной модели меланомы животным внутривенно вводили дакарбазин. Далее извлекали из опухолевого узла и дистантных органов метастазирования меланомы тотальную РНК и анализировали с помощью ПЦР-РВ уровни относительной экспрессии SIRT1, BCL2.

При воздействии дакарбазином на клетки меланомы B16, увеличивается пул G₀-положительных клеток, снижается доля клеток в фазах G₁ и G₂ клеточного цикла. В G₀-положительных клетках снижается уровень мРНК CDK4.

Дормантные опухолевые клетки могут локализоваться в дистантных органах, а их активация приводит к появлению метастазов. Определение содержания белка меланоцитов PMEL в органах-мишенях было проведено с помощью иммуногистохимического мечения. Результаты показали двукратное увеличение его экспрессии в легких мышей на фоне терапии дакарбазином, что указывает на формирование преметастатических ниш. В регуляции роста и развития меланомы в дистантных органах участвуют такие белки, как BCL2, являющийся ингибитором апоптоза и SIRT1, способствующий пролиферации клеток меланомы. При воздействии дакарбазином на клетки меланомы *in vivo* увеличился относительный уровень экспрессии антиапоптотического BCL2 в опухолевом узле в 5,7 раз. Относительный уровень экспрессии SIRT1 в легких снизился в 3,8 раза, в печени – повысился в 1,94 раза. Относительный уровень экспрессии BCL2 в легких снизился в 31 раз, в печени – повысился в 1,94 раза.

Таким образом, при воздействии дакарбазином на клетки меланомы, отмечается, что часть из них, сохраняя жизнеспособность, переходит в фазу покоя клеточного цикла. Появление клеток меланомы в дистантных органах сопряжено с изменением экспрессии паренхиматозными клетками этих органов апоптоз-ассоциированных белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 19-15-00110).

**ВЗАИМОСВЯЗЬ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ТКАНИ (ОПУХОЛЬ
И НЕИЗМЕНЕННАЯ ТКАНЬ) У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНЫМ
РАКОМ ЭНДОМЕТРИЯ ДО НАЧАЛА
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ**

Ливанос Е.И.^{1*}, Ермак Н.А.^{1,2}, Стахеева М.Н.^{1,2}

*¹ Сибирский государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск,
Россия*

*² Научно-исследовательский центр онкологии Томского
НИМЦ, Томск, Россия*

E-mail: kranosolnishko01@gmail.com*

Цель исследования. Оценить взаимосвязь клеточных популяций периферической крови и ткани (опухоль и неизменная ткань) у больных первичным раком эндометрия до начала противоопухолевой терапии.

Материалы и методы. В исследование были включены 4 пациентки с первичным раком эндометрия (РЭ) IA и IB стадии. Количество CD309+(VEGFR+) моноцитов в классической, неклассической и промежуточной субпопуляциях, CD8+цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти в периферической крови (ПК), опухолевой и неизменной тканях оценивали методом проточной цитометрии с использованием соответствующих моноклональных антител. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10.0.

Результаты. Выявлено, что клеточный состав как опухолевой ткани, так и неизменной ткани эндометрия у больных первичным РЭ имеет статистически значимые различия с таковым в периферической крови. Так, число CD14+ и CD309+CD14-16+ неклассических моноцитов, количество CD8+, CCR7CD45RO+ и CCR7CD45RA+ лимфоцитов в ткани значительно превышает соответствующие показатели в ПК, тогда как для CD16+популяции отмечено противоположное соотношение ($p < 0,05$). В свою очередь опухолевая и неизменная ткани эндометрия разнятся по

содержанию: CD8+279+, клеток центральной памяти с преобладанием их в неизменной ткани и CD45RA+, наивных клеток памяти с преобладанием в опухолевой ткани.

С помощью корреляционного анализа выявлена положительная связь ($r = 0,978$) между CD45+лейкоцитами в неизменной ткани эндометрия и количеством CD14+моноцитов в периферической крови, которые, вероятно, является основным пластическим ресурсом лейкоцитов в ткани. Коммитированные CCR7+CD45R0+клетки опухоли отрицательно связаны ($r = - 0,996$) с наивными CD45RA+ клетками в неизменной ткани, в том числе экспрессирующими CCR7. При этом наивные CCR7+CD45RA+клетки опухоли связаны положительно ($r = 0,989$) с наивными CCR7+CD45RA+ клетками в нормальной ткани.

Выводы. Исследование подтвердило наличие взаимосвязи между клеточными популяциями опухолевой, неизменной тканей и периферической крови у пациенток с раком эндометрия, которые, вероятно, связаны с патогенезом РЭ.

УГЛЕВОДНЫЕ КСЕНОАНТИГЕНЫ НА КЛЕТКАХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

**Липатников А.Д.^{1*}, Рапопорт Е.М.¹, Полякова С.М.¹, Чепанов
С.В.², Бовин Н.В.¹, Шилова Н.В.^{1,3}**

¹ *Институт биоорганической химии им. М.М. Шенякина и Ю.А.
Овчинникова, Москва, Россия*

² *Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии
и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Национальный медицинский исследовательский центр
акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика
В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Москва, Россия*

E-mail: alex.9508@yandex.ru*

Иммортализованные человеческие клеточные линии – основной инструмент, используемый для проведения исследований широкого

спектра, позволяющий варьировать различные параметры эксперимента в зависимости от поставленных задач. С помощью клеточных линий проводятся, в том числе, и исследования антител против углеводных антигенов. Предположительно, такие антигены являются мишенью для персистирующих в организме естественных антигликановых антител (АГАТ) – части пула естественных антител, чья функция заключается как в защите организма от патогенных микроорганизмов, так и в поддержании клеточного гомеостаза и надзоре за измененными клетками.

В исследованиях с помощью гликоэкрена нами была изучена специфичность АГАТ, связавшихся с клеточными линиями аденокарциномы толстой кишки HT-29 и эндотелиальной EA.hy926. В результате были обнаружены антитела против ксеноантигенов Galili (известного как α Gal-антиген) и гликолилинейраминовой кислоте Neu5Gc, т.е. антигенов, не характерных для клеток человека, и которые не синтезируются в них *de novo*.

Появление подобного рода ксеноантигенов на клетках связано с использованием фетальной сыворотки быка (ФСБ) в культуральных средах как источника необходимых для клеток компонентов. Известно, что содержащаяся в ФСБ Neu5Gc, способна включаться в процессы сиалилирования гликанов культивируемых клеток. Более того, поступая с пищей (преимущественно с красным мясом) и включаясь в метаболизм клеток ЖКТ, Neu5Gc вызывает хроническое воспаление (т.н. сиалит) за счет её распознавания человеческими антителами. Является ли сыворотка причиной экспрессии антигена Galili на клетках клеточных линий достоверно неизвестно.

Использование т.н. xeno-free сред для разрешения проблемы ксеноантигенов возможно, однако они далеко не универсальны: часть из них не предназначена для длительного культивирования клеток, а остальные часто имеют в составе выделенные из бычьей сыворотки белки (в т.ч. гликопротеины), что не исключает подобной контаминации.

Т.о. отсутствие комплексного исследования влияния ФСБ на гликопрофиль поверхности клеток клеточных линий и на другие

внутренние биохимические процессы, накладывает ряд ограничений по использованию таких моделей и тест-систем на их основе.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ
КУЛЬТУРЫ МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА**
**Мадиярова О.В.^{1*}, Белоглазова Е.П.², Могиленских А.С.^{1,2},
Сазонов С.В.^{1,2}**

*¹ Институт медицинских клеточных технологий,
Екатеринбург, Россия*

*² Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург, Россия*

E-mail: gubaeva_oksana@mail.ru*

Актуальность. Морфологические особенности клеток и экспрессия специфических маркеров играют одну из ключевых ролей в постановке диагноза меланомы, в том числе маркер MAGEA3 и индекс клеточной пролиферации Ki67. MAGEA3 — это раково-тестикулярный антиген, который имеет очень высокую частоту экспрессии в меланоме, раке яичников и раке легкого.

Цель исследования: оценить морфологию клеток, экспрессию MAGEA3 и Ki67 в процессе культивирования.

Материалы и методы. Для получения культуры опухолевую ткань измельчали, помещали в среду для диссоциации (смесь DMEM:F12, коллагеназа/гиалуронидаза) и инкубировали 17 часов в термостате. Полученную суспензию центрифугировали 30 сек. при 80g и при 200g - 3 мин. Далее супернатант сливали, а осадок ресуспендировали с трипсином и центрифугировали. После клетки культивировали в среде L-MEM, 10% FBS, 1% L-глутамин и 0,01% гентамицин. Оценку морфологических свойств проводили с помощью микроскопа Eclips TS100. Экспрессию Ki-67 и MAGEA3 оценивали на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter Navios.

Результаты. При изучении морфологии меланомы на разных пассажах (P) обнаружены разнообразие форм клеток. На P1 и P2 преобладали клетки веретеновидной формы с длинными цитоплазматическими отростками (59,9±1,5% и 49,8±1,75%). На P3

клетки сохраняли веретеновидную форму, однако приобретали короткие цитоплазматические отростки (51,4±4,9%). На P4 морфология клеток изменилась - количество многоотростчатых клеток (39,7±4,2%) преобладало над веретеновидными с короткими (23,8±2,45%) и длинными отростками (22,1±3,4%). Также в поле зрения были обнаружены округлые и гигантские клетки. Экспрессия MAGEA3 на всех 4-х пассажах была одинакова и составила в среднем 52,8±7,4%. Индекс пролиферативной активности Ki67 на P1 составил 39,9% и к P4 он уменьшился до 1,3%.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при культивировании меланомы, сохраняется экспрессия MAGEA3, в то время как изменяется морфология клеток и снижается уровень Ki67.

АКТИВАЦИЯ НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ СНИЖАЕТ ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЕМОЗОЛОМИДА В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Мазур Д.В.*, Гондаренко Е.А., Кудрявцев Д.С., Антипова Н.В.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

E-mail: dianamazur@yahoo.com*

Глиобластома (GBM) является наиболее агрессивным первичным злокачественным новообразованием центральной нервной системы (ЦНС) у взрослых. Медианная продолжительность жизни составляет около 14 месяцев после постановки диагноза. Опухоль отличается высокой гетерогенностью, характеризуется высокой скоростью роста и быстрым накоплением генетических мутаций, что способствует развитию устойчивости к стандартным методам лечения и препаратами, таким как темозоломид (ТМЗ).

Нейромедиаторы являются важными сигнальными молекулами нейрогенеза и гомеостаза в ЦНС. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR), широко экспрессированные в нервной системе, играют ключевую роль в регуляции нейромедиаторов, влияющих на рост и развитие клеток. Наряду с нервными клетками,

нейромедиаторы функционируют как необходимые компоненты микроокружения GBM, поскольку они проникают в опухолевую ткань и могут играть регулируемую роль в пролиферации, миграции, выживании, дифференцировке и ангиогенезе GBM.

В нашей работе мы использовали первичные клеточные культуры, полученные от пациентов: 011, 019, 067 и 022, а также модельную линию U87MG. Первичные культуры GBM культивировали с добавлением MACS NeuroBrew-21, EGF, bFGF в виде нейросфер для поддержания гетерогенности исходной опухоли. Влияние активности 7 подтипа nAHR изучалось с помощью полного агониста PNU282987 и положительного аллостерического модулятора PNU120596.

В результате нашей работы были получены данные о том, что в клетках первичных культур и клеточной линии U87MG экспрессируются nAHR. Более того, длительная инкубация с TMZ приводила к увеличению уровня экспрессии маркера стволовых клеток CD133, а также наблюдались изменения в экспрессии генов, кодирующих $\alpha 7$ и $\alpha 9$ субъединицы nAHR. Кроме того, активация nAHR увеличивала пролиферацию клеток GBM, а совместное действие лигандов nAHR и TMZ показало, что активация рецепторов может снижать или полностью нивелировать действие TMZ. Более того, эффекты лигандов nAHR могли перевешивать эффекты TMZ и клетки пролиферировали активнее. Однако, данный результат различался в зависимости от клеточной культуры и времени воздействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 24-15-00097).

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ОБЩЕЙ АНЕСТЕЗИИ НА МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

**Марченко Д.М.^{1,2*}, Михайлова Е.Р.¹, Леонова Е.А.², Ефремов
С.М.², Маргулис Б.А.¹, Гужова И.В.¹**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*² Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: berbimot@yandex.ru*

Онкологические заболевания являются второй (после сердечно-сосудистых) по распространенности причиной смертности в мире. Одним из основных методов лечения онкозаболеваний является хирургическое вмешательство. Однако опухолевый рецидив до сих пор остается острой проблемой для современной онкологии. На его развитие влияют множество факторов, в т.ч. препараты общей анестезии, применяемые при проведении операции.

Известно, что анестезирующие средства могут оказывать иммуномодулирующее действие на организм. Помимо этого, замечено, что анестетики могут влиять на синтез белков теплового шока в опухолевых клетках, высокие уровни продукции которых приводят к активации механизмов, отвечающих за пролиферативную активность и поддержание гомеостаза клеток, что в дальнейшем может привести к рецидиву рака.

В ходе работы мы определили, как пропофол и севофлуран, наиболее широко распространенные средства для внутривенной и ингаляционной анестезии соответственно, влияют на синтез белков теплового шока HSP70 и HSP90 в опухолевых клетках разного гистогенеза, и как в связи с этим меняются их основные характеристики, такие как темп роста, подвижность, способность формирования колоний и др. Полученные в ходе работы результаты помогут врачам-анестезиологам в выборе наиболее предпочтительного анестетика при хирургическом лечении онкологических больных, а также поставить вопрос о необходимости применения дополнительной терапии, направленной на изменение активности белков теплового шока.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25- 00078).

СЕЛЕКТИВНАЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ АМИНОПРОИЗВОДНЫХ АЗОЛО[1,5-*a*]ПИРИМИДИНОВ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК РАБДОМИОСАРКОМЫ

**Мелехин В.В.^{1,2*}, Тохтуева М.Д.¹, Ляпустин Д.Н.¹, Марусич
И.В.¹, Файзуллина Д.Ф.¹, Котовская С.К.¹, Русинов В.Л.¹**

¹ *Уральский федеральный университет имени первого
Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия*

² *Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург, Россия*

E-mail: v.v.melekhin@urfu.ru*

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности во всем мире, в частности, из-за резистентности и высокой токсичности существующих противоопухолевых препаратов. Азолопиримидины являются перспективными фармакологическими моделями, поскольку обладают разнообразными биологическими свойствами, в том числе противоопухолевыми (Eze C. C. et al., 2022). Известно действие азолопиримидиновых соединений на СК2-киназы, которые участвуют в процессах пролиферации клеток и подавлении апоптоза (Iegre J. et al., 2021).

В настоящей работе исследована противоопухолевая активность серии аминопроизводных азоло[1,5-*a*]пиримидинов на культурах клеток почки эмбриона (НЕК-293), глиобластомы (A172), рабдомиосаркомы (Rd) и остеосаркомы (HOS) человека *in vitro*. Одно из соединений исследованного ряда оказывает селективное токсическое действие на клетки рабдомиосаркомы Rd. По данным эксперимента с использованием 5-этинил-2-дезоксисуридина, который позволяет детектировать клетки, находящиеся в стадии активной репликации ДНК, установлено снижение пролиферативной активности только в опухолевых пробах, в то время как нормальные клетки НЕК-293 сохраняли интенсивность деления на высоком уровне. Соединение избирательно снижает потенциал

митохондриальной мембраны клеток рабдомиосаркомы Rd, что было подтверждено в тесте с использованием красителя JC-1, а также вызывает существенное снижение внутриклеточного уровня PIP₃, выполняющего важные функции в регуляции сигнальных путей.

Работа выполнена в рамках соглашения с Министерством науки и высшего образования № 075-03-2023-006 от 16.01.2023 (номер темы FEUZ-2023-0021).

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС КАК ОДИН ИЗ ФАКТОРОВ ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛИ

Миронова П.Г.* , Микеладзе М.А., Маргулис Б.А.,

Гужова И.В.

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: apolinamir@gmail.com*

Преодоление устойчивости к химиопрепаратам остается актуальной проблемой онкологии. Лекарственная резистентность обусловлена различными факторами, в том числе формированием стромы опухоли – гетерогенной структуры, содержащей клетки разного происхождения, в том числе мезенхимальные стволовые клетки (МСК). МСК преобладают в микроокружении и способствуют развитию онкологического процесса за счет взаимодействия с онкоклетками через паракринные механизмы. Кроме того, МСК склонны к отложению внеклеточного матрикса (ВКМ).

ВКМ составляет каркас опухоли и взаимодействует с интегриновыми рецепторами опухолевых клеток, активирующих пути синтеза антиапоптотических факторов и металломатриксных протеаз, что способствует устойчивости к терапии. Несмотря на большое количество теоретических данных о вкладе ВКМ МСК в развитие онкозаболеваний, экспериментальных работ по данной тематике недостаточно. В нашем исследовании мы сосредоточились на изучении влияния мезенхимального ВКМ на прогрессию опухоли костного происхождения.

В экспериментальной части использовали линию остеосаркомы человека – HOS. ВКМ получали из линии - FetMSC. Используя метод PCR-RT, было установлено, что после инкубации линии HOS

на матриксе, уровень синтеза мРНК генов эпителиально-мезенхимального перехода и стволовости увеличивается более, чем в три раза. Кроме того, синтез генов аларминов также повышался более, чем в 2 раза. Используя систему xCelligence, было показано, что помимо накопления маркеров лекарственной устойчивости, опухолевые клетки, инкубированные на матриксе, повышают свой миграционный потенциал. Это может приводить не только к снижению чувствительности к терапии, но и формированию вторичных очагов новообразования. Последней частью работы стала проверка эффекта ВКМ на устойчивость опухолевых клеток к химиопрепаратам. С помощью метода МТТ-тест, позволяющего оценить жизнеспособность клеток, было показано, что линия Nos, инкубированная на ВКМ, менее чувствительна к действию различных концентраций терапевтического агента оксалиплатина. Жизнеспособность онкоклеток после матрикса возрастала на 35-50%, по сравнению с контрольной группой, что свидетельствовало о существенном вкладе ВКМ в опухолевую прогрессию во время терапии.

ИЗМЕНЕНИЯ РЕЦЕПТОРНОГО АППАРАТА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ ЛЮМИНАЛЬНОГО А ПОДТИПА

**Могиленских А.С.^{1,2*}, Дерюгин М.И.^{1,2},
Демидов С.М.^{1,2}, Сазонов С.В.^{1,2}**

*¹ Институт медицинских клеточных технологий,
Екатеринбург, Россия*

*² Уральский государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Екатеринбург, Россия*

E-mail: annasajler@yandex.ru*

Актуальность. Первичные клеточные культуры используются как *in vitro* модели для исследования биологии рака. Однако в процессе пересевов может происходить трансформация и гибель культуры.

До сих пор остается открытым вопрос о соответствии фенотипа получаемой и пересеваемой культуры изначальному образцу.

Материалы и методы. Для получения культуры использовалась ферментативная дезагрегация коллагеназой-гиалуронидазой в течении ночи при н.у. Первичная культура рака молочной железы (РМЖ) получена из образца люминального А подтипа. Пересев осуществлялся на каждые 5 сутки. Всего произведено 11 пассажей (р). Для поддержания роста клеток использовалась среда Mammocult (STEMCELL, Канада). Уровень экспрессии рецепторов оценивался с помощью антител к эстрогену (РЭ), виментину (Ви), Ki-67 (Abcam, Канада), панцитокератину (ПЦК), Her2-neu (Biolegend, США) на проточном цитофлуориметре Navios 10 (Beckman Coulter, США).

Результаты.

Наиболее высокий уровень экспрессии рецепторов эстрогена наблюдался с р1-р6 и составил $63,8 \pm 3,4$ (ДИ:55,2-72,5%). На р7-р11 происходило уменьшение экспрессии РЭ до $24,3 \pm 4,3$ (ДИ:12,4-36,1%). Индекс клеточной пролиферации Ki-67 достигал высоких значений до четвертого пассажа и составлял $68,65 \pm 7,6$ (ДИ:44,3-92,9%), после р4 происходило снижение - $17,4 \pm 3,7$ (ДИ:8,1-26,5%). Высокие значения онкобелка Her2 обнаружены на р3 и на р9 (53,9% и 30,6%). Количество клеток, экспрессирующих только цитокератин и только виментин, менялось от пассажа к пассажию. Высокий уровень коэкспрессии маркеров обнаруживался на р2-р3 (59,5-78,3%). Выводы. Первичная клеточная линия, полученная из клеток рака молочной железы люминального А подтипа, демонстрирует высокий уровень индекса клеточной пролиферации и экспрессии рецепторов эстрогена до шестого пассажа. По остальным показателям обнаруживается выраженная гетерогенность.

ВЛИЯНИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА МИГРАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

**Морева В.О.^{1,2*}, Кригер Д.В.¹, Бобков Д.Е.¹,
Лапина Е.С.¹, Александер-Синклер Э.И.¹, Бильдюг Н.Б.¹**

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский государственный университет,*

Санкт-Петербург, Россия

E-mail*: 00hilf00@gmail.com

Известно, что патологический ангиогенез сопровождается эндотелиально-мезенхимным переходом (EndMT), при котором клетки эндотелия сосудов приобретают мезенхимный фенотип. Несмотря на роль EndMT в прогрессировании различных заболеваний, механизмы его регуляции остаются неизученными. С другой стороны, такие заболевания, как правило, сопровождаются выраженными изменениями состава и плотности внеклеточного матрикса (ВКМ).

Согласно нашим данным патологический ВКМ может приводить к индукции маркеров EndMT в клетках эндотелия. Поскольку EndMT характеризуется повышением миграционной активности клеток, целью данной работы было изучить влияние нормального и патологического ВКМ на процесс клеточной миграции как косвенного признака EndMT. Для этого клетки сосудистого эндотелия человека (HUVEC) культивировали на разных матриксах, включая коллаген I типа, представляющий собой ключевой белок ВКМ в организме человека, а также матриксы на основе разных концентраций желатина – продукта деградации коллагена, который накапливается *in vivo* в патологически измененных тканях.

Оценка клеточной подвижности показала, что культивирование HUVEC на 0.1% желатине способствовало более упорядоченной и целенаправленной траектории движения, что отражено на графике среднеквадратичного смещения. Кроме того, для клеток на матриксах наблюдалась выраженная зависимость скорости перемещения от времени в отличие от контрольных клеток (на пластике).

Поскольку важную роль в процессе клеточной миграции *in vivo* играют матриксные металлопротеиназы (ММП) – эндопептидазы, способные разрушать белки ВКМ, – также проводили исследование активности ММП-2 и ММП-9 в эндотелиоцитах, культивируемых на коллагене I, желатинах и Матригеле (ВКМ из саркомы мыши). Результаты не выявили существенных различий в активности ММП-9, тем не менее, наблюдалось статистически значимое повышение количества ММП-2 на Матригеле, что указывает на повышение миграционной активности клеток на этом матриксе и согласуется с нашими предыдущими результатами о том, что патологический ВКМ способен вызывать индукцию маркеров EndMT в клетках эндотелия. В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что измененный ВКМ может участвовать в регуляции процессов патологического ангиогенеза.

**МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ ДОРМАНТНЫХ КЛЕТОК
КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ПРИ ПОДАВЛЕНИИ
АКТИВНОСТИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ FOXO**

Моршнева А.В.^{*}, Гнедина О.О., Иготти М.В.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: 1195alisa@gmail.com*

Феномен позднего метастатического рецидивирования, когда возобновление опухолевого роста происходит спустя годы или даже десятилетия после ремиссии, тесно связан с понятием дормантности раковых клеток или обратимого состояния клеточного покоя (Endo et al., 2019). Разработка терапевтических подходов, нацеленных на дормантные клетки, может существенно снизить частоту опухолевого рецидива.

Ранее нами была разработана модель дормантности, основанная на цитотоксическом воздействии препаратов платины на платина-устойчивые клетки колоректального рака HCT116.

В данной работе в качестве мишеней для воздействия на дормантные клетки колоректального рака были выбраны транскрипционные факторы FoxO — многофункциональные регуляторы, вовлеченные

в комплексный ответ на клеточный стресс (Calnan et al., 2008). По нашим данным, экспрессия FoxO многократно усиливается при переходе платина-устойчивых клеток HCT116 в дормантное состояние.

Для подавления активности транскрипционных факторов FoxO использовали малую шпилечную РНК и химические ингибиторы FoxO: ингибитор FoxO1 вещество AS1842856 и ингибитор FoxO3 карбеноксолон (cbx).

По результатам оценки жизнеспособности клеток, подавление активности FoxO не оказывало выраженного эффекта на пролиферирующие клетки колоректального рака, однако вызывало гибель дормантных клеток.

Для выявления возможных механизмов участия FoxO в поддержании жизнеспособности дормантных клеток была проведена оценка изменений клеточного цикла, активности аутофагии и уровня окислительного стресса в дормантных клетках на фоне ингибирования FoxO.

Согласно полученным результатам, ингибиторы FoxO снижают активность аутофагии в дормантных клетках, вызывают накопление АФК и выводят клетки из покоящегося состояния через стимуляцию экспрессии пролиферативных генов и подавление экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ. Можно предположить, что эти процессы являются взаимосвязанными компонентами механизма действия ингибиторов FoxO на дормантные клетки.

Таким образом, FoxO имеют ключевое значение для поддержания жизнеспособности дормантных клеток колоректального рака и их подавление может быть использовано для элиминации дормантных клеток. Предлагаемый подход для снижения вероятности рецидива опухолевого роста наиболее перспективен как компонент комплексной терапии в комбинации с цитотоксическим воздействием.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-20164, <https://rscf.ru/project/24-25-20164> и гранта Санкт-Петербургского научного фонда.

**АГЛИКОНЫ ФЛАВОНОИДОВ ПРЕДОТВРАЩАЮТ ГИБЕЛЬ
ТРОМБОЦИТОВ, ВЫЗВАННУЮ ИНДУКТОРОМ
АПОПТОЗА АВТ-737**

**Найда Л.В.^{1*}, Балыкина А.М.^{2,3}, Рукояткина Н.И.³, Гамбарян
С.П.³**

*¹ Санкт-Петербургский политехнический университет им.
Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

*² Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

*³ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.
Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: nayda.lidiya@mail.ru*

Введение: Разработаны химиотерапевтические препараты-индукторы апоптоза канцерогенных клеток, например АВТ-737 – высокоафинный ингибитор белков семейства Bcl-2. Однако соединения данной группы способны вызывать апоптоз тромбоцитов с развитием тромбоцитопении. Тромбоцитопения также может быть обусловлена прокоагулянтной трансформацией тромбоцитов. Флавоноиды, соединения растительного происхождения, индуцируют апоптоз злокачественных клеток. Ранее мы показали, что агликоны флавоноидов ингибируют активацию тромбоцитов без изменения их жизнеспособности. Для АВТ-737 также была показана способность блокировать активацию тромбоцитов. Остается неизвестным, способны ли агликоны оказывать антиапоптотический эффект на тромбоциты, ингибировать их прокоагулянтную трансформацию и усиливать ингибирование активации, вызванное АВТ-737.

Цель: Исследование антиапоптотического эффекта ряда агликонов флавоноидов: лютеолина, мирицетина, кверцетина, эриодиктиола, кемпферола; изучение ингибирования активации и прокоагулянтной трансформации тромбоцитов под их воздействием.

Материалы и методы: Тромбоциты были выделены из крови здоровых доноров. Проточная цитометрия использовалась для определения экстернализации фосфатидилсерина (ФС). Определение степени

фосфорилирования белка vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) проводилось с помощью Western blot анализа.

Результаты: Одним из признаков апоптоза является каспаз-зависимая экстернализация ФС на внешней поверхности мембраны. Агликоны способствовали значительному снижению экстернализации ФС на поверхности тромбоцита, вызванной АВТ-737. Основными ингибирующими системами в тромбоцитах являются АС/сАМР/РКА и GC/сGMP/ПКГ. Ингибирование активации оценивалось по степени фосфорилирования белка VASP, субстрата РКА и РКГ. Исследуемые агликоны потенцировали фосфорилирование VASP, вызванное АВТ-737. Прокоагулянтные тромбоциты запускают кальций-зависимую экстернализацию ФС на внешней поверхности мембраны. Агликоны снижали экстернализацию ФС, индуцированную тромбином и collagen-related protein (CRP).

МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА SET7/9 КАК РЕГУЛЯТОР МАРКЕРОВ СТВОЛОВОСТИ В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ

Наминат Е.Д.* , Фролова К.А., Барлев Н.А., Дакс А.А.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: naminat03@gmail.com*

Метилтрансфераза SET7/9 представляет собой фермент, осуществляющий метилирование как гистонов, так и негистоновых белков. Например, было показано, что SET7/9 осуществляет монометилирование гистона H3 по 4 лизину (H3K4Me1), что активирует транскрипцию генов (Nishioka *et al.*, 2002). Среди негистоновых мишеней метилированию SET7/9 подвергаются опухолевый супрессор p53, β -катенин, α -рецептор эстрогена и другие, чем обеспечивается регуляция их активности в клетке (Daks *et al.*, 2024). За счет широкого спектра мишеней SET7/9 принимает участие в регуляции практически всех клеточных процессов.

В рамках данной работы была исследована роль SET7/9 в регуляции экспрессии маркеров стволовости в раковых клетках человека. Исследование проводилось на клеточных моделях рака молочной железы (РМЖ) со стабильным нокдауном SET7/9.

Согласно полученным данным, при подавлении активности метилтрансферазы SET7/9 происходит активация экспрессии стволовых факторов, таких как EpCam и Nanog. Более того, в ходе работы была создана трансгенная клеточная линия, содержащая репортерную конструкцию с генами Oct4 и Sox2, которые являются маркерами плюрипотентных клеток. В результате в клетках с нокдауном SET7/9 наблюдалась более яркая флуоресценция, что говорит о том, что большинство из них имело стволовый фенотип. Следует отметить, что имеющиеся в опухоли раковые стволовые клетки (РСК) способствуют резистентности, метастазированию и рецидиву онкологического заболевания. На основании полученных данных мы полагаем, что метилтрансфераза SET7/9 регулирует экспрессию про-стволовых факторов в клетках РМЖ человека и влияет на популяцию РСК МЖ. Как следствие, клетки РМЖ со сниженной экспрессией SET7/9 демонстрируют повышенную устойчивость к противоопухолевым препаратам. Таким образом, активация SET7/9 может рассматриваться как перспективная стратегия преодоления устойчивости клеток РМЖ к терапии и снижения вероятности рецидива заболевания. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 24-45-04002.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ STING И ОНКСУПРЕССОРА P53 В ОТВЕТЕ КЛЕТКИ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Невзоров И.А.^{1*}, Барлев Н.А.^{1,2}, Дакс А.А.¹

¹ *Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия*

² *Назарбаев Университет, Астана, Казахстан*

E-mail: ban140598@gmail.com*

Стимулятор генов интерферона (STING) представляет собой сигнальный белок, который регулирует сигнальный каскад, активирующий экспрессию провоспалительных генов при детекции чужеродной ДНК в клетке. Известно, что, помимо классического

ответа (активируемого cGAS), при альтернативной активации STING способен принимать участие в других клеточных процессах, таких как пролиферация, регуляция клеточного цикла, опухолевая трансформация и апоптоз (Crossley et al., 2023). Однако механизмы переключения функций сигнального пути STING не установлены. Известно, что STING фосфорилирует белок TBK1, образуя с ним комплекс, который, в свою очередь, приводит к активации транскрипционных факторов IRF3 и IRF7 (регуляторы интерферона 3 и 7, соответственно). Мы предположили, что данные факторы могут влиять на экспрессию генов, участвующих в регуляции апоптоза.

Онкосупрессорный белок p53 является одним из самых известных регуляторов апоптоза. Согласно имеющимся литературным данным, гены, кодирующие как p53, так и его транскрипционные мишени, потенциально регулируются факторами IRF3 и IRF7, мы предполагаем, что STING может принимать участие в координации проапоптотической активности белка p53.

Выбор генов-мишеней для анализа осуществлялся на основании литературных данных, при помощи программного обеспечения MEME suite был проведён сравнительный анализ 131 энхансерных и промоторных регионов проапоптотических генов и 66 аналогичных регионов антиапоптотических генов.

Для исследования использовались клеточные линии с повышенной экспрессией белков участников сигнального пути STING, а также клеточные линии H1299 с различным статусом белка p53. Для активации STING использовали метод липофектаминаковой трансфекции ДНК. Цитотоксический стресс в клетках был вызван при помощи митохондриальных блокаторов. Оценка активации участников STING-каскада, проапоптотических и антиапоптотических генов производилась при помощи методов вестерн блот и RT-PCR.

Полученные данные позволяют высказать предположение о возможном влиянии транскрипционных факторов IRF3 и IRF7 на регуляцию проапоптотических и антиапоптотических генов в условиях цитотоксического стресса различного генеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 24-45-04002.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ОРГАНОИДЕ ПЕЧЕНИ

**Невская К.В.¹, Рыжкова А.Ю.^{1*}, Ефимова Л.В.¹, Козлова П.К.¹,
Хмелевская Е.С.¹, Литвяков Н.В.², Удуд Е.В.¹, Першина А.Г.¹**

*¹ Сибирский государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск,
Россия*

² НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, Томск, Россия

E-mail: alya.ryzhkova.2003@mail.ru*

Метастазирование представляет собой каскад последовательных процессов, приводящих к образованию вторичных опухолевых очагов, и является одной из основных причин смертности онкологических больных. В связи с этим актуальным является разработка *in vitro* моделей пролиферации опухолевых клеток во вторичных очагах (микрометастазах) для изучения механизмов метастазирования, а также скрининга эффективности антиметастатических лекарственных препаратов.

Целью работы являлась разработка модели перехода микрометастаза рака молочной железы человека в макрометастаз в органоиде печени.

Для формирования 3D микрооргана использовали суспензию единичных клеток, полученную путем дезагрегации печени мыши линии C57BL/6 с использованием коллагеназы II. Для моделирования dormantных опухолевых клеток во вторичном очаге использовали популяцию дифференцированных CD44⁻ клеток генетически-модифицированной линии люминального рака молочной железы человека, экспрессирующей красный флуоресцентный белок (RFP) – T47D_red. Клетки печени мыши и CD44⁻ клетки T47D_red смешивали в соотношении 15:1 в полной питательной среде Вильямса и рассаживали в предварительно подготовленные 81-луночные формы из агарозы. Для индукции

дифференцировки опухолевых клеток в лунки добавляли ИЛ6. В качестве прототипа антиметастатического препарата использовали смесь микроРНК, согласно протоколу, ранее отработанному в нашей лаборатории. Оценку пролиферации флуоресцентно-меченных клеток T47D_Red в органоиде печени проводили в течение 7 дней методом флуоресцентной микроскопии.

После добавления ИЛ6 наблюдали увеличение количества флуоресцирующих клеток линии T47D_red в составе органоида печени в течение всего срока инкубации. В органоидах, проинкубированных с микроРНК, клетки T47D_red не пролиферировали. На 7 сутки при окраске Calcein AM была подтверждена жизнеспособность клеток, входящих в состав органоида.

Таким образом, предложена модель перехода микрометастаза рака молочной железы человека в макрометастаз в органоиде печени, пригодная для скрининга перспективных противоопухолевых препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФНТП развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение №075-15-2021-1073) и программы «Приоритет 2030».

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ HSP70 НА ПОДВИЖНОСТЬ КЛЕТОК МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ

**Оганесян Е.А.^{1,2*}, Лихоманова Р.Б.^{1,2}, Бобков Д.Е.^{1,2}, Аксенов
Н.Д.¹, Нечаева А.С.², Самочерных К.А.², Юдинцева Н.М.^{1,2},
Шевцов М.А.^{1,2}**

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Национальный Медицинский Исследовательский Центр им.*

В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: praskovya_p@mail.ru*

Высокий инвазивный потенциал клеток мультиформной глиобластомы (МГБ) человека является одним факторов прогрессирования заболевания. Показана экспрессия мембранно-

связанного белка теплового шока mHsp70 у опухолевых клеток, которая отсутствует у нормальных клеток. Предполагается, что клетки с высоким уровнем экспрессии mHsp70 могут обладать повышенной подвижностью. Таким образом, Hsp70 можно рассматривать в качестве таргетной мишени для ингибирования клеточной подвижности. Целью работы была оценка действия различных ингибиторов Hsp70 на подвижность клеток первичной культуры МГБ человека.

В работе были использованы клетки первичной культуры МГБ человека. С помощью метода конфокальной микроскопии у клеток МГБ была выявлена экспрессия mHsp70. Результаты проточной цитофлуорометрии в первичных культурах МГБ выявили две субпопуляции клеток: с низким (mHsp70^{Low}) и высоким (mHsp70^{High}) уровнем экспрессии mHsp70. После проведения сортировки клеток (FACS) выполняли оценку скорости их движения под влиянием ингибиторов Hsp70 (PES с субстратсвязывающим доменом и JG-98 с нуклеотидсвязывающим доменом). В качестве контроля использовали клетки без воздействия ингибиторов. Оценка подвижности проводили с помощью автоматической системы визуализации клеток Image ExFluorger в течение 24 часов. Полученные данные анализировали в GraphPad Prism. Было показано, что скорость клеток с mHsp70^{High} была выше, по сравнению со скоростью клеток с mHsp70^{Low}. Кроме того, было выявлено статистически значимое снижение скорости движения клеток mHsp70^{High} под влиянием ингибитора PES. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии корреляции между повышенным уровнем экспрессии mHsp70 и клеточной подвижностью. Снижение подвижности клеток МГБ с mHsp70^{High} под воздействием ингибитора PES предполагает перспективность исследования его воздействия на другие опухолевые клетки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ РЕПАРАЦИИ ДНК ПРИ
ИНГИБИРОВАНИИ СОЗРЕВАНИЯ ЛАМИНА А**

**Осипова В.Р.^{1,2*}, Лаврушкина С.В.², Овсянникова Н.Л.²,
Киреев И.И.²**

*¹ Московский государственный университет им. М.В.
Ломоносова, Москва, Россия*

*² НИИ Физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
Московский государственный университет им. М.В.
Ломоносова, Москва, Россия*

² E-mail: osipova.veronika.2003@mail.ru*

Метастазирование опухолевых клеток – одна из ключевых проблем в онкологии, обусловленная активацией миграции клеток. Влияние на механические свойства клеточного ядра является новым подходом, ограничивающим миграцию в плотном клеточном матриксе. Ламины А- и В-типа определяют вязкоупругие свойства ядра. В посттрансляционных модификациях, необходимых для формирования зрелого ламина А, ключевую роль играет ZMPSTE24. Ингибирование этого фермента приводит к накоплению незрелого ламина А, преламина А. При этом наблюдается повышение жесткости и хрупкости ядра. Однако накопление преламина А приводит к нарушению репарации ДНК и снижает устойчивость к механическому стрессу, что сопровождается увеличением повреждений ДНК. Поэтому для применения ингибиторов ZMPSTE24 в терапии, направленной на снижение уровня метастазирования, необходимо исследовать их влияние на систему репарации.

В данной работе была использована клеточная линия фибросаркомы человека HT1080. Клетки обрабатывали лопинавиром, фозиноприлом и ловастатином для накопления преламина А. После этого воздействовали малыми дозами этопозида для индукции дцДНК разрывов. Эффективность восстановления ДНК оценивали в нескольких временных точках с помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа и высокопроизводительного

скрининга для детектирования уН2АХ и 53BP1, маркеров разрывов дцДНК.

В результате, было показано, что обработка ингибиторами увеличивает начальный уровень поврежденных дцДНК и замедляет их репарацию, что подтверждается ростом количества и интенсивности флуоресценции меченных фокусов уН2АХ и 53BP1. Измененная колокализация фокусов по сравнению с контролем демонстрирует нарушение сборки системы репарации ДНК. Фозиноприл показывает наиболее близкую к норме динамику репарации среди исследованных ингибиторов, что делает его предпочтительным выбором для минимизации побочных эффектов. Авторы благодарят Программу развития МГУ (ПНР 5.13) и ЦКП "Субдифракционная микроскопия и спектроскопия" МГУ за предоставление доступа к оборудованию.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО И АНТИМИГРАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА АКТИНОПОРИНОВ

**Павленко А.П. *, Кветкина А.Н., Чингизова Е.А., Менчинская
Е.С., Климович А.А., Юрченко Е.А., Лейченко Е.В.**

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б.

Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

E-mail: apavlenko141@gmail.com*

Актинопорины – цитолитические полипептиды, которые содержатся в ядовитом секрете морских анемонов. Эти соединения формируют поры в мембранах клеток, содержащих сфингомиелин, что приводит к их гибели. Известно, что повышенное содержание этого сфинголипида на наружной мембране имеют опухолевые клетки. Сфингомиелин в составе клеточной мембраны образует сеть водородных связей, чрезмерная плотность которой нарушает меж- и внутриклеточные сигналы, что лежит в основе инициации онкогенеза и уклонения их от иммунного ответа (Tallima et al., 2021). Ранее было обнаружено, что Hct-S3, актинопорин морской анемоны *Heteractis magnifica* (ранее *H. crispa*), обладает эффективной

антимиграционной активностью (Kvetkina et al., 2020). Выдвинуто предположение, что такая активность может быть следствием не только пороформирующей способности токсина, но и его взаимодействия с интегринами посредством имеющегося в структуре RGD-мотива – сайта узнавания интегринов.

В данной работе была исследована активность актинопорина Hct-S3 (в модели *in vivo*) и его аналогов с мутациями в RGD-мотиве – Hct-S3(RGA) и Hct-S3(AGA) (в моделях *in vitro*). Было показано, что Hct-S3(RGA) и Hct-S3(AGA) в нетоксичных концентрациях от 1 до 4 мкМ подавляют миграцию клеток аденокарциномы кишечника человека HT-29 значительно меньше, от 30 до 75%, чем это было показано при тех же концентрациях для Hct-S3 – до 99% (Kvetkina et al., 2020). В *in vivo* исследованиях на модели солидной карциномы Эрлиха, привитой белым мышам линии Balb/c, Hct-S3 в дозе 0,02 мкг/кг не оказывал выраженного влияния на рост опухоли, но практически полностью подавлял ее метастазирование.

ВЛИЯНИЕ АПТАМЕРА VI-(A1D-1T) НА КУЛЬТУРЫ ПЕРВИЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ И КУЛЬТУРЫ РЕЦИДИВОВ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Павлова С.А.^{1*}, Фаб Л.В.¹, Савченко Е.А.², Павлова Г.В.^{1,2}

¹ *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

² *НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*
E-mail: Pavlova.sweti@yandex.ru*

Глиобластома - наиболее агрессивная форма глиальных опухолей головного мозга человека, характеризующаяся быстрым ростом и высокой инвазивностью. Она составляет 60-70% всех глиом, а средняя продолжительность жизни пациентов с момента постановки диагноза составляет менее 15 месяцев.

Имеющиеся подходы к терапии не приводят к полной ремиссии, а токсическое влияние на здоровые клетки ухудшает здоровье и качество жизни пациентов. Это делает необходимым поиск новых

подходов к лечению. Одним из недавних подходов стали аптамеры - короткие одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, которые могут высокоспецифично связываться с белками-мишенями, обладают малым размером и низкой токсичностью.

В ходе работы было исследовано влияние аптамера bi-(AID-1T) на клеточные культуры глиобластомы человека полученные из первичных опухолей и из рецидивов.

Были исследованы по 3 клеточные культуры глиобластомы человека в каждой из групп. К каждой из культур добавляли bi-(AID-1T) в концентрации 10 мкМ и через 72 часа проводили исследования.

Аптамер bi-(AID-1T) оказывал антипролиферативный эффект на клеточные культуры, полученные из первичных опухолей, снижая уровень пролиферации на 22-44%. На культурах, полученных из рецидивов, значимого антипролиферативного эффекта не наблюдалось.

После воздействия bi-(AID-1T) во всех культурах рецидивов наблюдалось значительное увеличение миграционной активности, при этом в двух культурах первичных опухолей происходило снижение уровня миграции.

При оценке изменения уровней экспрессии маркеров стволовости и злокачественности методом иммуноцитохимии после добавления bi-(AID-1-T) показано, что в клеточных культурах первичных глиом происходит рост уровня экспрессии CD133, L1CAM, Cas3, Sox2 и CD44. В культурах рецидивов глиом, помимо увеличения экспрессии L1CAM, и CD44, наблюдается увеличение экспрессии EGFR и Nestin и снижение экспрессии p53.

Таким образом, клеточные культуры рецидивов оказались более устойчивыми к воздействию: в них не наблюдался антипролиферативный эффект аптамера и происходило усиление миграционной активности. При этом в обеих группах культур наблюдалось увеличение уровня экспрессии маркеров стволовости. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта №75-15-2024-561

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРИАЗОЛО[1,5-*a*]ПИРИМИДИН-7-АМИНОВ

Парамонова А.В.^{1*}, Тохтуева М.Д.¹, Мелехин В.В.^{1,2}, Федотов
В.В.¹, Ушакова А.А.¹, Котовская С.К.¹, Русинов В.Л.¹

¹ *Уральский федеральный Университет имени первого
президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия*

² *Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург, Россия*

E-mail: a.v.paramonova@urfu.ru*

Неоплазии, выступая в качестве одной из ведущих причин смертности в мире (Aberoumandi S. M. Et al., 2017), характеризуются высокой резистентностью. В связи с этим существует необходимость поиска новых терапевтических стратегий. Некоторые производные азолопиримидинов являются перспективными объектами в терапии онкологических заболеваний (Нюо J.-L. et al., 2021).

В рамках данной работы осуществлена оценка цитотоксического действия триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-аминов на культивируемые клетки легкого эмбриона человека (Wi-38), колоректальной аденокарциномы (CaCo-2), рабдомиосаркомы (Rd) и карциномы мочевого пузыря (T-24). По результатам МТТ-теста рассчитаны концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀). Исследован предполагаемый механизм действия соединения-лидера, который заключается в цитостатическом эффекте, замедляющем репликацию ДНК и активность деления неопластических клеток без запуска апоптотических механизмов.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-аминов как потенциальных противоопухолевых агентов.

Работа выполнена в рамках соглашения с Министерством науки и высшего образования № 075-03-2023-006 от 16.01.2023 (номер темы FEUZ-2023-0021).

**АНАЛИЗ АКТИВИРУЮЩИХСЯ КЛЕТОЧНЫХ ПУТЕЙ
ХОЛАНГИОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ
СЕКРЕТОРНЫХ ПРОДУКТОВ *OPISTHORCHIS FELINEUS*
Пономарев Д.В.* , Лишай Е.А., Запарина О., Пахарукова М.Ю.**

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

**E-mail: p.dmitr@outlook.com*

При хроническом описторхозе, вызванном инфекцией трематоды *Opisthorchis felineus* развивается предраковое изменение – неоплазия эпителия желчных протоков человека, характеризующееся пролиферацией и дисплазией клеток, увеличении многослойности эпителия, потерей контакта клеток с базальной мембраной и т.д. Механизмы неоплазии холангиоцитов не исследованы. Экскреторно-секреторный продукт и экзосомы трематоды, вероятно, содержат различные регуляторные молекулы, которые увеличивают пролиферацию и миграцию холангиоцитов.

Целью нашего исследования было исследовать вовлеченность различных клеточных путей в регуляции пролиферации и миграции на клеточной модели холангиоцитов человека под действием секреторных продуктов *Opisthorchis* с помощью ингибиторного анализа, а также исследования транскриптома клеток.

Исследование проводили на перевиваемой культуре холангиоцитов человека H69 и клетках гепатомы HepG2. Экскреторно-секреторный продукт и экзосомы получали из среды содержания взрослых особей *O. felineus*. кДНК-библиотеки получали из мРНК клеток H69, секвенировали на платформе DNBSEQ 2X150 п.н. (BGI, Китай).

Внеклеточные везикулы и экскреторно-секреторный продукт *O. felineus* вызывают специфическое увеличение количества клеток и скорости миграции клеточной культуры холангиоцитов человека H69, но не клеток гепатомы HepG2, при этом ингибитор EGFR рецептора, а также ингибитор TACE протеаз (маримастат) предотвращают увеличение скорости миграции холангиоцитов человека.

Внеклеточные везикулы и экскреторно-секреторный продукт *O. felineus* вызывают дифференциальную экспрессию схожего набора генов холангиоцитов человека, относящихся к путям клеточной миграции, гипоксии, NF- κ B, гепатоклеточной карциноме, связанной с EGF, ответа на TNF, клеточной миграции, клеточной адгезии, организации внеклеточного матрикса, эпителиально - мезенхимального перехода.

Таким образом, на клеточной модели холангиоцитов человека впервые показана активация клеточных путей, которая может объяснить неоплазию эпителия желчных протоков человека при описторхозе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект №24-44-00048).

ВЛИЯНИЕ ХЛОРОХИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ЭФФЕКТОРОВ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ ЛЕЙКЕМИИ MOLT-3

**Прокopenko E.C.^{1,3*}, Трубникова А.Д.^{2,3}, Соколова Т.В.³, Надей
О.В.³**

¹ *Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

² *Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.
Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия*
E-mail: prokopenko.ekaterina01@mail.ru*

Механизмы устойчивости опухолей к цитотоксическим препаратам до сих пор не ясны. Часто причиной химиорезистентности является аутофагия, активируемая как альтернативный источник энергии, поэтому ее ингибиторы, например, хлорохин (CQ), тестируются как компоненты комбинированной терапии. Однако в зависимости от типа рака аутофагия может как подавлять, так и усиливать опухолевый процесс. Цель работы – оценка возможности

использования CQ для модуляции активности аутофагии в клетках Т-лимфобластной лейкемии MOLT-3.

Клетки MOLT-3 культивировали в среде RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой или без неё. Жизнеспособность клеток, обработанных 10-100 μ M CQ в течение 24 ч, определяли методом МТТ. Экспрессию генов аутофагии (*ULK1*, *BECN1*, *MAPLC3B*) и апоптоза (*BCL2*, *BAX*, *CASP3*) в клетках, инкубированных с 30 μ M CQ, оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

При культивировании клеток в полной ростовой среде в течение 24 ч с 10 μ M CQ их жизнеспособность составила 104.5%, с увеличением концентрации CQ до 30, 50 и 100 μ M упала до 78.8%, 57.7% и 18.1% по сравнению с контролем. В бессывороточной среде с 10, 30, 50 и 100 μ M CQ жизнеспособность клеток снизилась до 78.0%, 51.7%, 36.9% и 5.4%.

После культивирования клеток с 30 μ M CQ экспрессия гена *ULK1*, кодирующего инициаторный белок аутофагии Ulk-1, снизилась только в полной ростовой среде. Ни в одной из сред обработка клеток CQ не повлияла на экспрессию генов *BECN1* и *MAPLC3B*, кодирующих маркеры формирования фагофоры и аутофагосомы Beclin-1 и LC3B. Уровень мРНК гена *BCL2*, кодирующего анти-апоптотический белок Bcl-2, снизился в присутствии CQ в полной ростовой среде, но увеличился в среде без сыворотки. Экспрессия генов *BAX* и *CASP3*, кодирующих про-апоптотический белок Bax и ключевой эффектор апоптоза каспазу-3 снизилась после удаления сыворотки.

Таким образом, ингибирование аутофагии CQ в условиях сывороточного голодания подавляло процессы апоптоза, увеличивая соотношение экспрессии генов про- и анти-апоптотических посредников *BCL2/BAX*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-25-00316.

УВЕЛИЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ИНГИБИТОРОВ ЦИКЛИН ЗАВИСИМЫХ-КИНАЗ ПРИ ПЕРЕДАЧЕ СИГНАЛА ЧЕРЕЗ TNFR1 В ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГАХ МЫШИ

**Пухальская Т.В.^{1,2*}, Богданова Д.А.^{1,2}, Михайловская В.С.²,
Демидов О.Н.^{1,2}**

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *АНОО ВО Научно технологический университет «Сириус»,*

Сириус, Россия

E-mail: tomapukhalskaya@gmail.com*

В последнее время все больше внимания уделяют влиянию клеточного старения или так называемого состояния сенесцентности (от англ. senescence) на рост и развитие опухоли (Schmitt et al., 2022). Особый интерес в контексте сенесцентности представляют макрофаги, ассоциированные с опухолью (от англ. Tumor-associated macrophages, TAM), которые составляют наиболее распространенную популяцию иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль (Dehne et al., 2017). Как клетки иммунной системы, они во многом определяют иммунный ландшафт микроокружения опухоли и могут способствовать прогрессированию заболевания (Haston et al., 2023). Ранее были опубликованы данные касательно иммунозависимого старения в ответ на IFN- γ и TNF. Это старение было вызвано цитокинами, секретируемыми Th1 клетками, и строго требовало передачи сигналов STAT1 и TNFR1 (Braumüller et al., 2013).

Нами было продемонстрировано, что в фибробластах (Bogdanova et al., 2024) и макрофагах, ассоциированных с опухолью (CAFs, TAMs), для индукции иммунозависимого старения достаточно передачи сигнала только через TNFR1. Использование человеческого TNF (hTNF) в нашей работе в качестве индуктора позволило нам специфически нацелиться на TNFR1, но не на TNFR2 в клетках мыши. Было продемонстрировано, что сигналинг через TNFR1 как в CAFs, так и в TAMs мыши увеличивает экспрессию ингибитора циклин-зависимых киназ P16^{Ink4a}. В CAFs, также

повышалась экспрессия ИЛ-6, одного из цитокинов входящих в состав факторов SASP. Однако несмотря на первичные данные, полученные нами для опухоль-ассоциированных макрофагов, которые являются иммунными клетками, причину секреции ИЛ-6 сложно отделить от классической активации данного типа клеток и причислить экспрессию данного цитокина к SASP. Тем не менее для TAMs наиболее интересным оказалось повышение экспрессии ингибитора циклин-зависимых киназ p21^{сип} в ответ на hTNF. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-20128-П). Работа Пухальской Т.В. и Богдановой Д.А. частично поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; Проект НИР-ИМБ-2102).

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ
ПРЕПАРАТОВ АБИРАТЕРОН И ЭНЗАЛУТАМИД С
ПОМОЩЬЮ ОРГАНОИДНЫХ КУЛЬТУР, ПОЛУЧЕННЫХ
ИЗ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ПРОСТАТЫ**

Рябов В.М.^{1*}, Тяпкин Н.И.², Гужова И.В.¹

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*² Ленинградский региональный клинический онкологический
диспансер имени Л.Д. Романа, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: voldemryabov@yandex.ru*

В большинстве случаев рак предстательной железы (РПЖ) протекает в форме латентного заболевания, не требующего активного терапевтического вмешательства. Однако в некоторых случаях он приобретает агрессивную метастатическую форму, устойчивую к медикаментозному лечению и приводящую к быстрой смерти пациента. Преодолеть эту проблему возможно с помощью развития персонифицированной терапии. Одним из подходов данной терапии может являться оценка эффективности лекарственных препаратов на органоидных культурах (ОК), которые представляют собой сфероиды, сформированные из клеток, полученных из опухолевой и нормальной простаты у пациентов.

Такие культуры, выращиваемые на трехмерной подложке из Матригеля, сохраняют свойства исходной опухоли в течение длительного времени (Ryabov et al, 2023).

Для проведения исследования были применены лекарственные препараты, такие как Абиратерон и Энзалутамид, которые относятся к группе антиандрогенных средств, эффективных при лечении рака простаты. В ходе эксперимента к клеточным культурам, как 2D, так и 3D, состоящим из опухолевых и нормальных клеток, полученных от пациентов, были добавлены указанные препараты в концентрации 10 μM на 500 мкл среды DMEM (24-луночный планшет). В качестве контрольных групп использовались 2D и 3D культуры опухолевых и нормальных клеток, которым добавляли только растворитель лекарственных средств. Клетки выращивались в течение 10 дней, для 2D культур осуществлялся подсчет клеток с использованием камеры Горяева, а для органоидных культур - под проходящим светом на микроскопе Axiovert 200M. Образцы клеток были взяты у 9 пациентов.

Результаты исследования свидетельствуют о более значительном замедлении роста опухолевых и нормальных клеток при использовании Энзалутамида по сравнению с Абиратероном как в двумерных, так и в трехмерных клеточных культурах. Во всех образцах не было выявлено устойчивости к лекарственным препаратам. Наши данные подтверждают возможность использования ОК в качестве модели для оценки эффективности лекарственных средств при персонализированной терапии.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-25-00162.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ MDIV1-1 НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА *IN VITRO*

Сабирова С. В.^{1*}, Будюкова А. А.¹, Марков Н.И.², Гомзикова
М.О.¹, Ризванов А.А.¹, Барлев Н.А.^{1,3}, Симон Х-У.^{1,2}

¹ *Институт фундаментальной медицины и биологии*

Казанского федерального университета, Казань, Россия

² *Институт фармакологии Бернского университета, Берн,
Швейцария*

³ *Назарбаев Университет, Астана, Казахстан*

E-mail: kurbangaleeva_s@mail.ru*

В настоящее время не существует достаточного количества данных о воздействии ингибитора митохондриального деления mdivi-1 на клетки колоректального рака (КРР), в частности на опухолевые клетки, демонстрирующие отличные друг от друга митохондриальные характеристики. Ранее на клеточных линиях КРР, НСТ-15 и LS123, нами было показано, что первые демонстрируют сниженные массу митохондрий и митохондриальный мембранный потенциал по сравнению со вторыми. Мы предположили, что данные клеточные линии будут иметь разный ответ на обработку mdivi-1 в зависимости от их митохондриального статуса из-за нарушения деления митохондрий. В связи с этим целью нашей работы явилась оценка влияния mdivi-1 на выживаемость клеток КРР с разным потенциалом митохондриальной мембраны и массой митохондрий.

Mdivi-1 тестировали в концентрации 20 мкМ на клеточных линиях LS123 и НСТ-15 в течение 72 часов. В качестве контроля использовались необработанные клетки. Мы осуществили окрашивание клеток красителями Cell Trace Violet для измерения скорости пролиферации и AnnexinV/PI для оценки жизнеспособности клеток методом проточной цитометрии.

Мы обнаружили, что обработка mdivi-1 в концентрации 20 мкМ НСТ-15 и LS123 приводит к снижению процента жизнеспособных клеток по сравнению с контрольными образцами на 22,1±8,5% и 9,7±1,5% соответственно. Вместе с этим наблюдается повышение

количества ранних апоптотических клеток в 4,5 раза для НСТ-15 и в 1,5 раза для LS123. Также было выявлено, что mdivi-1 снижает скорость пролиферации НСТ-15 и LS123 по сравнению с контрольными образцами в 2,2 раза и в 1,1 раза соответственно. Таким образом, эффект mdivi-1 на относительную скорость пролиферации и жизнеспособность оказался выраженнее для клеточной линии НСТ-15 в сравнении с клеточной линией LS123. Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства РФ (проект № 075-15-2021-600). Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030».

**КОСТНОМОЗГОВОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ СНИЖАЕТ
ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИШЕНЬ-НАПРАВЛЕННОГО
ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КЛЕТКИ ХРОНИЧЕСКОГО
МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ
МОДЕЛЬ ДЛЯ ПОИСКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ
КОМБИНАЦИЙ**

**Савин А.М.^{1*}, Болдырихин А.Ю.¹, Татарский В.В.²,
Штиль А.А.³**

*¹Международный научный центр SCAMT, Университет
ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;*

²Институт биологии гена РАН, Москва, Россия;

*³Национальный медицинский исследовательский центр
онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, Россия
E-mail*: savin@scamt-itmo.ru*

Ключевые слова: хронический миелоидный лейкоз, ингибиторы BCR-ABL, костный мозг, лекарственная устойчивость.

Введение. Ингибиторы химерной тирозинкиназы BCR-ABL (ТКИ) – важнейшие препараты для мишень-направленной терапии хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ). Микроокружение опухолевых клеток в костном мозге (элементы стромы, внеклеточный матрикс и др.) может способствовать “ускользанию” клеток ХМЛ от цитотоксического действия ТКИ. Для преодоления

этого клинически неблагоприятного феномена требуются комбинации ТКИ и блокаторов эпигенетической лекарственной устойчивости.

Цель. Разработать модель костномозговой “ниши” и установить возможность комбинаций ТКИ с другими соединениями для индукции гибели клеток ХМЛ.

Материалы и методы. Сокультивирование стромальных клеток костномозгового происхождения (линия HS5) с клетками ХМЛ (линия K562), адгезия клеток K562 к белкам межклеточного матрикса, оценка выживаемости клеток.

Результаты. Для моделирования протективного действия костномозгового микроокружения наиболее эффективным оказалось сокультивирование с костномозговыми фибробластами HS5 или использование среды, кондиционированной этими клетками (IC₅₀ виматиниба (4е поколение ТКИ) в обычной среде 2.3±0.4 нМ против 13.6±1.4 нМ в кондиционированной среде). Фибробласты внекостномозгового происхождения не влияли на ответ клеток K562 к виматинибу. Скрининг комбинаций препаратов с виматинибом выявил наибольшую эффективность руксолитиниба (ингибитор JAK2) и сенексина В (CDK8/19) в повышении чувствительности клеток K562 к виматинибу. Клеточный цикл показал фазу фрагментированной ДНК (subG1) после 3 дней инкубации 8,4±2,3% для клеток в кондиционированной среде HS5 под воздействием виматиниба и 21,1±1,5% для комбинации виматиниба и сенексина В.

Выводы. Снижение цитотоксичности ТКИ в модели костномозгового микроокружения вызвано растворимыми факторами, секретлируемыми фибробластами. Разработанная модель позволяет выявить новые молекулярные мишени для преодоления устойчивости клеток ХМЛ в костномозговых “нишах”.

ПОЛУЧЕНИЕ κДНК БЕЛКА АКТИВИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ-α ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЕННО- ИНЖЕНЕРНЫХ КЛЕТОК

Соловьева С.В.^{1,2*}, Смирнов И.В.¹, Варганян Н.Л.¹, Шашкова
О.А.¹, Самойлович М.П.^{1,2}

¹ *Российский научный центр радиологии и хирургических
технологий имени акад. А.М. Гранова, Санкт-Петербург,
Россия*

² *Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: sonyasoloveva79702@gmail.com*

Белок активированных фибробластов-α (FAP) – биомаркер клеток стромы опухолей разного гистогенеза. Его рассматривают в качестве мишени для диагностики и таргетной терапии злокачественных новообразований.

Целью работы являлось получение полноразмерной последовательности *FAP* для создания клеточной линии, стабильно экспрессирующей биомаркер и предназначенной для тестирования таргетных к *FAP* препаратов.

Подбор клеток-доноров гена провели среди клеточных линий глиобластом человека. Экспрессию *FAP* оценили методом ПЦР-РВ в интактных и подвергнутых ионизирующему излучению клетках. Наибольшую активность гена наблюдали в облученных клетках линии A172, κДНК которых стала матрицей для амплификации *FAP*. В качестве референсного гена использовали последовательность из базы данных NCBI (NM_004460.4). Анализ CDS показал наличие гомополимерных и АТ-богатых участков, а длина целевого фрагмента составляла 2283 п.н., что в совокупности вызвало трудности при дизайне праймеров и амплификации *FAP* методом стандартной ПЦР. Для решения проблемы сконструировали несколько пар олигонуклеотидов и использовали разные ДНК-полимеразы (Taq, Epcyclo и Q5), но ни в одном случае не получилось синтезировать полноразмерный ампликон.

Было решено амплифицировать целевую последовательность по частям, для этого создали дополнительные праймеры. Для секвенирования полученные половины гена клонировали в вектор pKAN-T. В результате показали, что в *FAP* присутствует SNP A > G, частота которой составляет < 0,01 (rs78722278). По-видимому, клетки-доноры глиобластомы линии A172 являются носителями редкого аллельного варианта гена-интереса. Для получения референсного варианта *FAP* сконструировали олигонуклеотиды и провели сайт-направленный мутагенез. Исправленные фрагменты объединили методом ОЕ-ПЦР.

Таким образом, была получена соответствующая референсной полноразмерная последовательность целевого гена, которая будет использована при создании генно-инженерных клеток для тестирования препаратов, аффинных к *FAP*.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ МІСА И МІСВ, МАРКЕРОВ КЛЕТЧНОГО СТРЕССА

Столбовая А.Ю.^{1*}, Грязева И.В.¹, Крутецкая И.Ю.¹, Терехина Л.А.¹, Шашкова О.А.¹, Пиневиц А.А.^{1,2}, Варганын Н.Л.¹, Кнеев А.Ю.¹, Смирнов И.В.¹

¹ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени акад. А.М. Гранова, Санкт-Петербург, Россия;

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

E-mail: anastasia.stolbova@gmail.com*

Молекулы МІСА и МІСВ, гомологи МНС I класса, являются лигандами NKG2D рецепторов НК-клеток. Для ухода от распознавания иммунной системы опухолевые клетки образуют растворимые формы МІСА/МІСВ, которые способствуют снижению цитотоксической активности НК-клеток. Увеличение концентрации

растворимых МІСА/МІСВ связано с негативным прогнозом выживаемости пациентов с злокачественными новообразованиями. Детекция этих молекул с помощью моноклональных антител (МКАТ) затруднена ввиду выраженного аллельного полиморфизма МІСА и МІСВ.

Цель работы — создать панель МКАТ к высокополиморфным МІСА и МІСВ и разработать на её основе сэндвич-ИФА для количественного определения их растворимых форм.

На основе биоинформатического анализа полиморфизма экстраклеточных частей МІСА/МІСВ создали панель рекомбинантных антигенов (АГ), которая охватывала 93% и 95,5% аллельного разнообразия МІСА и МІСВ, соответственно, в европейской популяции.

С помощью гибридной технологии получили 10 штаммов клеток-продуцентов МКАТ к наиболее распространённым аллельным вариантам МІСА*008 и МІСВ*005. С помощью конкурентного ИФА установили, что МКАТ распознавали как минимум три эпитопа на каждом АГ. В непрямом ИФА показали, что МКАТ взаимодействовали со всеми аллельными вариантами АГ, против которых они были получены, но обладали выраженной в разной степени кросс-реактивностью.

На основе МКАТ создали системы сэндвич-ИФА для определения концентраций растворимых форм МІСА или МІСВ. Сэндвич-ИФА не были способны выявить все аллельные варианты АГ. Использование коктейля из двух МКАТ для сенсibilизации твердой фазы и смеси двух конъюгатов повысило чувствительность детекции АГ и расширило спектр выявляемых аллельных вариантов МІСА и МІСВ. Используя коллекцию образцов плазм крови, полученных от пациентов с раком предстательной железы, мы показали, что разработанные системы сэндвич-ИФА позволяли надёжно определять уровни МІСА и МІСВ в клинических образцах. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (№21-15-00021).

**СРАВНЕНИЕ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ УРОЛИТИНА А
И ЕГО ПРОИЗВОДНОГО KIRS152 В ЦИСПЛАТИН-
ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ СТАРЕНИЯ
ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА**

Строчкова Н.Ю.

Московский государственный университет им. М.В.

Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: stornatala@yandex.ru*

Препарат цисплатин, обладающий цитостатической активностью, применяется как противоопухолевое средство при лечении ряда онкологических заболеваний. Однако цисплатин вызывает преждевременное старение здоровых клеток. Исследования указывают на участие дисфункции митохондрий в процессе старения. Их удаление в ходе митофагии может помочь в борьбе со старением. Уролитин А – метаболит эллаговой кислоты, вызывающий митофагию, но не разобщающий окислительное фосфорилирование и дыхание. Мы предположили, что геропротекторный эффект уролитина А может быть усилен за счёт разобщения. Цель данной работы - сравнение защитного эффекта уролитина А и его производного с липофильным радикалом состава C₆H₁₃ – KIRS152 – в модели цисплатин-индуцированного старения фибробластов кожи человека.

Исследование проводилось на нормальных первичных фибробластах от здоровых доноров. Для оценки проявления сенесцентного фенотипа были использованы следующие методы: резазуриновый тест токсичности, гистохимическая оценка проявления ассоциированной со старением β-галактозидазы, определение содержания цитокина GDF15 с помощью иммуноферментного анализа и p53 с помощью вестерн-блоттинга, а также оценка индекса старения (ИС) с помощью проточной цитометрии. ИС рассчитан по следующей формуле: $ИС = ((nAF - 1) + 5 \times (nD - 1))/2$, где nAF – автофлуоресценция липофусцина, а nD – диаметр клетки. Индукция старения проводилась по схеме: 24 часа клетки культивировали с добавлением 10 мкМ цисплатина, после

отмывки клетки культивировали с исследуемыми веществами. На 7-е сутки проводили анализ признаков сенесцентного фенотипа. KIRS152 в концентрации до 100 мкМ оказывает меньший токсический эффект, чем уролитин А, а в концентрациях от 2 до 25 мкМ дозозависимо снижает ИС. KIRS152 снижает секрецию GDF15, максимальный эффект - при 2 мкМ. Уролитин А снижает уровень GDF15 в меньшей степени. KIRS152 и уролитин снижают долю β -гал-положительных клеток и уровень экспрессии p53, причем эффект KIRS152 более выраженный. Таким образом, KIRS152 обладает лучшими защитными свойствами, чем уролитин А, и является менее токсичным, а значит, KIRS152 является более перспективным для снижения токсичности цисплатина. Исследование проведено при поддержке РНФ, номер проекта 23-14-00061

УЛЬТРАСТРУКТУРА ПРОКСИМАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КАНАЛЬЦЕВ И ФИЛЬТРАЦИОННОГО БАРЬЕРА ПОЧКИ ПРИ ВВЕДЕНИИ ВЫСОКИХ ДОЗ ЛИТИЯ КАРБОНАТА МЫШАМ С МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

Таскаева Ю.С.^{1,2*}, Касатова А.И.¹, Таскаев С.Ю.¹, Бгатова Н.П.²

¹ Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН,

Новосибирск, Россия

² НИЦ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал

ФИЦ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

E-mail: inabrite@yandex.ru*

Литий является перспективным агентом для проведения нейтронозахватной терапии (НЗТ) онкологических заболеваний, поскольку обладает большим сечением поглощения теплового нейтрона и обеспечивает 100 %-ную локальность выделения энергии внутри клетки, в сравнении с бором, традиционно использующимся в НЗТ. Предполагается, что введение высоких доз лития будет способствовать накоплению лития в опухолевых клетках в концентрациях, требуемых для успешной НЗТ, однако в настоящий момент неизвестно, будут ли такие дозы токсичными для организма,

учитывая то, что повреждение почек является одним из наиболее распространенных побочных эффектов при терапии литием.

Целью исследования являлась оценка ультраструктуры почки при введении высоких доз лития карбоната (ЛК) мышам с имплантированной меланомой кожи В16.

В эксперименте использовали клеточную линию меланомы кожи В16 и мышей С57BL/6. Животных делили на 11 групп (n=5): контрольная группа; 5 групп, получавших ЛК в дозе 300 мг/кг и 5 групп, получавших ЛК в дозе 400 мг/кг. Животных выводили из эксперимента через 15 мин, 30 мин, 90 мин, 180 мин и 7 дней после введения ЛК. Аутопсийный материал (почки) проводили по стандартной методике для электронной микроскопии, морфометрию электронограмм выполняли с помощью программы ImageJ.

Достоверных различий между контрольной и опытными группами среди исследованных параметров (толщина гломерулярной базальной мембраны и базальной мембраны эпителиоцитов проксимальных канальцев, ширина и количество ножек подоцитов, количество фенестр эндотелиоцитов гломерулярных капилляров, ширина целевой диафрагмы) выявлено не было. Отмечалось набухание эпителиоцитов проксимальных канальцев и снижение эндосом на ранних сроках эксперимента (15-180 минут), свидетельствующее о дистрофических изменениях с последующей регенерацией при сохранении участков набухания цитоплазмы эпителиоцитов через 7 суток. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования ЛК в дозах, требуемых для успешной нейтронозахватной реакции.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 19-72-30005).

ПЛАТИНОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ (II) С ВЫСОКОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Тохтуева М.Д.^{1*}, Мелехин В.В.^{1,2}, Ельцов О.С.¹, Абрамов В.М.¹

¹ Уральский федеральный университет имени первого
Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

² Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург, Россия

E-mail*: maria.tokhtueva@urfu.ru

Препараты платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин, применяющиеся в медицинской практике для лечения онкологических заболеваний, в настоящее время не имеют аналогов, которые обладали бы большей эффективностью и меньшей токсичностью, что позволило бы повысить качество противоопухолевой терапии. Перспективным направлением является синтез и изучение арилбипиридиновых комплексов.

Мы показали выраженное противоопухолевое действие серии новых соединений платины (II), в несколько раз превышающее активность цисплатина, который использовался в качестве положительного контроля. Для некоторых образцов показатель IC₅₀ составлял менее 500 нМ на неопластических клетках. При изучении потенциального механизма действия соединений-лидеров было установлено практически полное подавление потенциала внутренней митохондриальной мембраны, а также цитостатическое действие одного из образцов в отношении клеток глиобластомы A172. В эксперименте с Annexin V-FITC, новые комплексы платины (II) не продемонстрировали индукцию апоптоза, являющегося основным механизмом действия платиновых препаратов, использующихся в медицинской практике в настоящее время. Было также отмечено некоторое влияние на выработку активных форм кислорода в опухолевых клетках. Все вышеописанные результаты делают данные соединения перспективными фармакологическими молекулами, обладающими высокой биологической активностью и механизмом действия, отличным от применяющихся в медицинской практике препаратов платины, противоопухолевая активность

которых в большей степени связана с блокировкой клеточного цикла через образование сшивок с ДНК и запуском апоптоза.

Работа поддержана грантом РФФ №23-23-00375.

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ
ОРГАНИЗАЦИИ ИНТЕРАКТОМА ШАПЕРОНА HSP70 В
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

**Федоров В.С.^{1,2,3*}, Колесниченко Ю.В.¹, Лихоманова Р.Б.^{1,2},
Юдинцева Н.М.^{1,2}, Нечаева А.С.², Зиганшин Р.Х.⁴, Шевцов
М.А.^{1,2,5}**

¹ *Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Национальный Медицинский Исследовательский Центр им.
В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

⁴ *Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия*

⁵ *Клиника Rechts der Isar, Технический Университет Мюнхена,
Мюнхен, Германия*

E-mail: fedorovvs.biotech@gmail.com*

Белки теплового шока (HSP), в частности, представители семейств HSP70 и HSP90, являются центрами фолдинга белков клетки, и способны взаимодействовать с молекулами, опосредующими миграцию и инвазию клеток опухолей. Данное свойство важно в изучении прогрессии глиальных опухолей головного мозга, где гиперэкспрессия HSP связана с процессами онкогенеза (Shevtsov et al, 2020). В настоящее время развивается метод анализа интерактома HSP, демонстрирующий функциональные узлы механизмов прогрессии опухолей (Chiosis et al, 2023). Цель исследования: выявить функциональные закономерности в интерактоме мембранно-связанного HSP70 опухолей ЦНС. Для изоляции интерактома были синтезированы конъюгаты магнитных наночастиц с моноклональными антителами к HSP70. Полученные частицы были способны захватывать интерактом *in vitro* из клеток первичной культуры глиобластомы (послеоперационного материал,

РНХИ имени проф.А.Л. Поленова) и клеточных линий (ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”). В качестве контроля взят интерактом моноцитов периферической крови здоровых доноров. Интерактом анализировали с помощью масс-спектрометрии (SCIEX TOF 5800) с обработкой базы белков в программе Cytoscape. В ходе анализа было показано, что сети белков, выделенные из первичных культур, обладали большей гетерогенностью и централизацией по сравнению с моноцитами здоровых доноров. Набор белков миграции и инвазии (PLEC, EPPK, JUP) - кластер, представленный для всех проанализированных интерактомах опухолей ЦНС. Также выявлен кластер HSP (с такими интеракторами как CALR, PNB, ENO1), который может является потенциальной мишенью для ингибиторов, нарушающих его функциональную организацию. Предполагается, что организация сетей HSP70 определяет агрессивность новообразований, а элементы шаперона играют роль узлов биологических процессов в интерактоме.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

**ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ER-ПОЗИТИВНОГО РАКА
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ОТ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ПЛАСТИЧНОСТИ К ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ
ВОЗМОЖНОСТЯМ**

Федорова О.А.^{1,2}

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Институт Вейцмана, Израиль*

E-mail: fedorovaolga0402@gmail.com

Рак – многофакторное заболевание, вызванное как генетическими мутациями и факторами окружающей среды, так и эпигенетическими изменениями. Рак молочной железы характеризуется гетерогенностью как у разных больных, так и внутри каждой опухоли.

При этом гетерогенность является одним из основных признаков злокачественности. Гетерогенность опухолей может быть вызвана также пластичностью клеток, когда клетки приобретают разную идентичность в зависимости от внешних факторов. Пластичность может быть также вызвана изменением эпигенетики клеток, что влияет на изменение экспрессии генов без изменений в последовательности ДНК. Понимание эпигенетических изменений в раковых клетках, которые приводят к гетерогенности опухолей важно для поиска оптимальных схем химиотерапии. Эпигенетические ингибиторы или активаторы можно использовать в сочетанной терапии, чтобы “заблокировать” клетки в определенном состоянии. В нашей работе мы использовали наиболее распространенный тип рака молочной железы - ER-позитивный подтип - как модель для исследования. Клетки этого типа рака экспрессируют эстрогеновый рецептор, который позволяет использовать эстроген для пролиферации клеток. Лечение данного типа рака основано на гормональной (эндокринной) терапии.

К примеру, для лечения ER-позитивного рака молочной железы широко используется тамоксифен, который показывает хорошие результаты в течение 5 лет применения, но зачастую опухоли становятся резистентными в течение более долгого времени. Мы показали к каким эпигенетическим изменениям приводит влияние тамоксифена в раковых клетках, как это влияет на пластичность и, в результате, на гетерогенность опухолей ER-позитивного подтипа.

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УБИКВИТИН-ЛИГАЗЫ MDM2
НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ В КЛЕТОЧНЫХ
ЛИНИЯХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО
ЧЕЛОВЕКА A549 И H1299**

Фефилова Е.А.* , Шувалов О.Ю.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: e.fefilova@list.ru*

Убиквитин-лигаза MDM2 – основной негативный регулятор онкосупрессора p53. MDM2 убиквитинилирует белок p53, что

приводит к его деградации в 26S протеосомном комплексе, способствуя онкогенезу. Известно, что помимо p53 MDM2 взаимодействует с более чем двумя сотнями белков. В нашей лаборатории ранее были получены данные о том, что ряд метаболических ферментов гликолиза и одноуглеродного метаболизма физически взаимодействует с MDM2.

В данном исследовании мы изучили, как меняется количество данных белков в клетках при сверхэкспрессии *MDM2*, а именно: ферментов гликолиза (LDHA, ALDOA, HK2), одноуглеродного метаболизма (MTHFD2, SHMT2), транскрипционного фактора c-Myc и регулятора анаболических процессов mTOR. Чтобы оценить вклад p53-MDM2 взаимодействия в наблюдаемые явления, при проведении экспериментов нами были использованы клеточные линии немелкоклеточного рака легкого человека с различным статусом p53: A549 (*TP53+*) и H1299 (*TP53-*). С использованием лентивирусной трансдукции мы создали по 3 различных типа клеток, на основе каждой линии: сверхэкспрессирующие *MDM2* «дикого типа» (обозначен как MDM2), каталитически-неактивный мутант *MDM2* (Mut), а также контрольные клетки (несущие контрольный вектор pCDH). Для оценки влияния MDM2 на экспрессию мы использовали ПЦР в «режиме реального времени» и иммуноблоттинг. Оценку мембранного потенциала митохондрий и содержания активных форм кислорода проводили с использованием проточной цитометрии с флуоресцентными красителями. Анализ интенсивности гликолиза и дыхания был проведен с использованием технологии метаболического профилирования Seahorse.

Было выявлено, что сверхэкспрессия *MDM2* дикого типа приводит к увеличению количества исследуемых ферментов на уровне белка, а также способствует интенсификации гликолиза и митохондриального метаболизма. MDM2-зависимая интенсификация энергетического метаболизма не зависит от p53, однако зависит от наличия у MDM2 убиквитин-лигазной активности.

Полученные данные могут быть полезны в контексте противоопухолевой терапии, направленной на восстановление

функций p53 в опухолевых клетках (ингибиторы p53-MDM2 взаимодействия).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 21-75-10138.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДНОГО СОЕДИНЕНИЯ БЕРБЕРИНА КАК АКТИВАТОРА МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ SET7/9

Фролова К.А.*, Наминат Е.Д., Барлев Н.А., Дакс А.А.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: kseaf2003@gmail.com*

Несмотря на большой прогресс в исследовании онкоассоциированных процессов и разработке противораковой терапии, злокачественные новообразования до сих пор остаются одной из основных причин смертности во всем мире. Поэтому поиск новых мишеней и подходов для эффективного лечения данной группы заболеваний не теряет своей актуальности.

В качестве одной из перспективных мишеней для противоопухолевой терапии рассматривается метилтрансфераза Set7/9 – фермент, осуществляющий метилирование гистоновых и негистоновых мишеней, что регулирует активность, стабильность и внутриклеточную локализацию таких белков, как p53, NFkB, FOXO3 и др. Таким образом, Set7/9 принимает участие в координации таких клеточных процессов как апоптоз, дифференцировка, метаболизм (Daks *et al.*, 2024). Set7/9 задействован и в регуляции сигнальных каскадов, и может являться как онкосупрессором, так и онкогеном в клетках определенного типа рака (Gu *et al.*, 2022), а ингибитор Set7/9 рассматривается как перспективный противоопухолевый препарат. При этом показано, что Set7/9 проявляет онкосупрессорные функции при раке молочной железы, что делает актуальной задачу поиска фармацевтических активаторов данного фермента.

В рамках этой работы было проведено изучение соединения берберина как возможного активатора метилтрансферазы Set7/9.

Берберин – изохинолиновый алкалоид, который обнаружен в корнях некоторых растений, например, *Berberis vulgaris*. Показано, что берберин стимулирует углеводный обмен, а также оказывает противоопухолевый, антиокислительный и противовоспалительный эффекты, с чем связано его использование в качестве биологически активной добавки.

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что берберин способен активировать Set7/9 как на уровне экспрессии мРНК, так и на уровне белка. Также нами был предложен возможный механизм активации: берберин снижает уровень метилирования гистона H3, являющегося мишенью Set7/9, по четвертому лизину (H3K4Me1). Мы предполагаем, что снижение данной гистоновой модификации приводит к компенсаторному повышению уровня экспрессии Set7/9.

Полученные нами данные позволяют рассматривать берберин как компонент сочетанной терапии рака молочной железы для повышения ее эффективности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 24-45-04002.

**ВЛИЯНИЕ 5-ГИДРОКСИМЕТИЛФУРФУРОЛА НА
МИГРАЦИЮ КЛЕТОК ОПУХОЛИ ГОЛОВНОГО МОЗГА**
Ханов Р.С.^{1,2*}, Федоров В.С.^{1,3,4}, Николаев Б.П.¹, Лихоманова
Р.Б.^{1,3}, Шевцов М.А.^{1,3,5}

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

³ Национальный Медицинский Исследовательский Центр им.
В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Технический Университет Мюнхена, Мюнхен, Германия

E-mail*: khanoff.roman2015@yandex.ru

Злокачественные опухоли центральной нервной системы (ЦНС), в особенности экспрессирующие 70 кДа белок теплового шока на

поверхности плазматической мембраны (mHSP70), отличаются высокой способностью к инвазии и прогрессии, и потому требуют поиска новых терапевтических стратегий.

Целью данной работы являлось исследование влияния 5-гидроксиметилфурфузола (5-HMF) как потенциального противоопухолевого агента на миграционную активность опухолевых клеток ЦНС, экспрессирующих mHSP70.

Оценка миграции клеточных линий глиомы крысы C6 и глиобластомы человека T98G оценивалась методом застывания раны при внесении 5-HMF в культуральную среду (диапазон концентраций 0,05 – 0,4 мМ). Изучение цитотоксичности препарата и экспрессии mHsp70 производилось с использованием методов конфокальной микроскопии и проточной цитометрии.

Результаты исследований продемонстрировали, что 5-HMF не оказывает токсического воздействия на клетки C6 и T98G в изученном диапазоне концентраций. При этом отмечалось концентрационно-зависимое влияние 5-HMF на экспрессию mHSP70 и миграционную активность клеток. Согласно результатам исследования застывания раны (для клеток T98G), при добавлении 5-HMF в концентрации 0,05 мМ наблюдалось снижение миграционной активности на 20% по сравнению с контролем (клетки без обработки). При дальнейшем увеличении концентрации препарата до 0,4 мМ возрастала миграционная активность клеток в 4 раза по сравнению с контролем, что также сопровождалось увеличением экспрессии mHSP70 на мембране.

В заключение, полученные данные указывают на возможность применения 5-HMF для снижения миграционной активности опухолевых клеток в диапазоне концентраций 0,05 – 0,4 мМ, однако необходимы дальнейшие исследования его терапевтической активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СЕКРЕТОМА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА

**Шаповалова А.А.^{1,2*}, Кригер Д.В.¹, Аксенов Н.Д.¹, Оганесян
Е.А.¹, Лихоманова Р.Б.¹, Михайлова Н.А.¹, Шевцов М.А.¹,
Юдинцева Н.М.¹**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный Университет,

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: alenasplyv@gmail.com*

Для оценки влияния опухолевых клеток на их нормальное микроокружение разрабатывают различные модели исследования, в т.ч., оценивают свойства клеток, находящихся в состоянии сфероидов. Известно, что опухолевые клетки экспрессируют мембранную форму белка теплового шока 70 (mHsp70), которая отсутствует у нормальных клеток. Таким образом, появление экспрессии mHsp70 у нормальных клеток может косвенно свидетельствовать о приобретении ими опухолевого фенотипа. Целью работы являлась оценка влияния секрета клеток первичной культуры мультиформной глиобластомы (МГБ) человека на характер формирования сфероидов мезенхимными клетками костного мозга и выявление у них экспрессии mHsp70. В работе использовали клетки линии FetMSC и клетки первичной культуры МГБ человека. Формирование сфероидов проводили в 96-луночной плате (Nunclon Sphera). При формировании сфероидов использовали среду, кондиционированную клетками МГБ в течение 3-х суток. В качестве контроля были использованы среды для культивирования FetMSC и для культивирования клеток МГБ. Оценку характера формирования сфероидов проводили с использованием системы клеточного анализа CQ1 с режимом съемки каждые 2 часа в течение 48 часов, далее с помощью программы ImageJ анализировали их площадь. Экспрессию mHsp70 у клеток линии FetMSC выявляли с помощью конфокальной микроскопии и проточной цитофлуорометрии. Окраску клеток антителами на mHsp70

проводили в течение 25 мин на льду. Формирование клетками линии FetMSC более плотных сфероидов, имеющих минимальную площадь, по сравнению с контрольными вариантами, было отмечено под воздействием среды, кондиционированной клетками МГБ. Результаты конфокальной микроскопии и проточной цитофлуорометрии также выявили экспрессию mHsp70 у клеток линии FetMSC под воздействием опухолевого секретома. Полученные результаты демонстрируют влияние секретома опухолевых клеток на характер формирования сфероидов нормальными клетками. Кроме того, выявленная экспрессия mHsp70 может свидетельствовать о возможном изменении фенотипа клеток линии FetMSC и приобретении ими опухолевого фенотипа. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2020-773).

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА И ДЕГРАДАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПРИ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЕ ЧЕЛОВЕКА

Шатрук А.Ю.^{1,3*}, Бгатова Н.П.¹, Еремина А.В.², Трунов А.Н.², Черных В.В.², Таскаева Ю.С.^{1,3}

¹ Научно-исследовательский центр клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

E-mail: anastasiashatruk@yandex.ru*

Увеальная меланома (УМ) – опухоль, развивающаяся из меланоцитов сосудистой оболочки глаза. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) играет ключевую роль в инвазии и метастазировании, а также в приобретении химиорезистентности

УМ. Деградация внеклеточного матрикса (ВКМ) способствует миграции и приобретению мезенхимальных свойств опухолевыми клетками. Таким образом, актуальным является исследование особенностей процессов ЭМП и ремоделирования ВКМ, способствующих прогрессированию УМ.

Цель исследования: оценить уровень экспрессии белков ЭМП и деградации ВКМ при увеальной меланоме.

В качестве объекта исследования были использованы фрагменты энуклеированных глаз пациентов Новосибирского филиала ФГАУ НМИЦ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ. Исследование было проведено в соответствии с принципами Хельсинской декларации, на проведение исследования было получено разрешение локального этического комитета НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН (протокол № 180 от 28.04.2023). Образцы опухолей и постэкваториальной зоны хориоидеи фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида и подвергали стандартной процедуре пробоподготовки для проведения иммуногистохимического окрашивания на такие маркеры, как E-Cadherin, Vimentin, Decorin, матриксная металлопротеиназа, MMP9, тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы, TIMP1.

В результате исследования в опухолях были выявлены высокие уровни маркеров, связанных с ЭМП: E-кадгерина и виментина. Наблюдалось снижение декорина – белка участвующего в стабилизации ВКМ. Соотношение белков MMP9/TIMP1, регулирующих деградацию ВКМ, являлось более высоким в строме опухолей, по сравнению с постэкваториальной зоной хориоидеи.

Полученные результаты могут свидетельствовать об активации процессов ЭМП-подобного перехода клеток УМ и деградации ВКМ, в совокупности способствующих развитию коллективной инвазии при УМ.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН (проект № NFWNR-2022-0012).

**ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА
SLURP-1 И ЕГО ПЕПТИДНОГО МИМЕТИКА ONCOTAG
IN VIVO**

**Шлепова О.В.^{1,2*}, Шуленко М.А.³, Шипунова В.О.^{1,2}, Бычков
М.Л.¹, Деев С.М.¹, Кирпичников М.П.^{1,4}, Шенкарев З.О.^{1,2},
Люкманова Е.Н.^{1,3,4}**

¹ *Институт биоорганической химии им. академиков М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия*

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

³ *Шеньчжэньский МГУ-ППИ Университет, Шэньчжэнь,
Китай*

⁴ *Московский государственный университет им. М.В.
Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: shlepova.olga@yandex.ru, ekaterina-lyukmanova@yandex.ru*

Активация никотинового ацетилхолинового рецептора $\alpha 7$ типа ($\alpha 7$ -nAChR) способствует росту и метастазированию опухолей эпителиального происхождения. Секретируемый белок человека SLURP-1, антагонист $\alpha 7$ -nAChR, экспрессируется клетками эпителия, регулирует гомеостаз эпителия и защищает клетки от злокачественной трансформации. Известно, что SLURP-1 подавляет рост и миграцию клеток карцином и глиом *in vitro*, а повышенная концентрация SLURP-1 в крови пациентов с карциномой поджелудочной железы положительно коррелирует с лучшей выживаемостью пациентов.

В данной работе мы исследовали активность SLURP-1 и синтетического пептида, имитирующего его петлю I (Oncotag) в ксенографтной модели опухоли *in vivo*, а также молекулярные механизмы этой активности. Мы показали, что ежедневное внутривенное введение SLURP-1 или Oncotag в течение 10 дней подавляло рост опухоли и метастазирование в ксенографтной модели опухоли, а также вызывало устойчивые изменения в экспрессии генов и микроРНК в опухолях. И SLURP-1, и Oncotag не продемонстрировали острой токсичности и иммуногенности.

Примечательно, что Oncotag приводил к более длительному подавлению проонкогенной передачи сигналов и снижению экспрессии проонкогенной микроРНК-221 и повышению экспрессии белка KLF4, отвечающего за контроль дифференцировки клеток. С помощью аффинной экстракции было показано взаимодействие SLURP-1 как с $\alpha 7$ -nAChR, так и с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), в то время как Oncotag демонстрировал селективное взаимодействие с $\alpha 7$ -nAChR. Таким образом, селективное ингибирование $\alpha 7$ -nAChR препаратами на основе Oncotag может стать перспективной стратегией терапии рака. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-74-00040).

**20-ГИДРОКСИЭКДИЗОН (ЭКДИСТЕРОН) УСИЛИВАЕТ
ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ И
БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В МИОБЛАСТАХ
И ФИБРОБЛАСТАХ**

Шувалов О.Ю.*, Кирдеева Ю.Н., Фефилова Е.А., Дакс А.А.,
Федорова О.А., Парфеньев С.Е., Барлев Н.А.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: oleg8988@mail.ru*

20-Гидроксиэкдизон (экдистерон, 20E) – стероидный гормон членистоногих, обладающий рядом полезных фармакологических свойств у млекопитающих и человека. Среди прочих, для данного соединения характерны анаболическая, антиоксидантная, гипогликемическая, кардио-, гепато-, нейропротекторная, противоопухолевые и другие фармакологические активности. Несмотря на то, что в ряде исследований продемонстрированы анаболические свойства 20E в мышечных клетках, все они были сфокусированы на 20E-зависимом увеличении размера миофибрилл, интенсивности биосинтеза белка и модуляции экспрессии миостатина без какого-либо исследования его влияния на энергетический метаболизм. В настоящем исследовании мы продемонстрировали, что 20E усиливает как катаболизм, так и

анаболизм, интенсифицируя продукцию энергии и биосинтетические метаболические процессы в клеточных моделях мышечных миобластов и фибробластов. Используя транскриптомный подход, мы идентифицировали 20E-опосредованную активацию генов, участвующих в различных метаболических процессах. Дальнейшие эксперименты показали, что 20E повышает уровень ферментов, участвующих в гликолизе и одноуглеродном метаболизме. 20E увеличивал поглощение глюкозы, гликолиз, дыхание, продукцию АТФ и биосинтез белка. Параллельно с этим наблюдалось снижение продукции АФК. С использованием ингибитора PI3K (LY294002) мы показали вовлеченность PI3K/AKT/mTOR сигнального пути в 20E-зависимое усиление энергетического метаболизма. Продемонстрированная нами 20E-опосредованная интенсификация метаболических процессов может быть основной причиной хорошо известной анаболической активности 20E.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 24-45-04002.

Секция «Физические основы жизни»

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ФЛАВОНОВ ЛЮТЕОЛИНА И БАЙКАЛЕИНА НА ХОЛЕСТЕРИН-СОДЕРЖАЩУЮ МЕМБРАНУ

Архипов А.В.* , Мартынюк В.А., Малыхина А.И., Ефимова С.С.,
Остроумова О.С.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: arkhipov.art@mail.ru*

Флавоны являются классом растительных полифенолов и характеризуются выраженной биологической активностью. В частности, байкалеин и лютеолин обладают противоопухолевым и противовоспалительным эффектами (Laura Franza et al 2020; Zhihua Hu et al., 2021). Липофильность этих молекул, как и других ранее изученных флавоноидов позволяет им встраиваться в липидную мембрану и изменять такие электрические параметры как граничный потенциал (ГП) мембраны и его компоненту – дипольный потенциал.

Изменение ГП мембраны при адсорбции флавонов оценивали по изменению нонактин-индуцированного трансмембранного тока, протекающего через липидный бислои, сформированный методом Монтала и Мюллера (Montal and Mueller, 1972). Плоские липидные бислои формировали из смеси фосфатидилхолина (ДОФХ) и холестерина (ХОЛ) в молярном соотношении 67 и 33 %, а также чистого ДОФХ. Методом молекулярного моделирования были собраны в CHARMM-GUI. GROMACS 2023.2, применяемый для выполнения компьютерных симуляций с использованием общепринятого силового поля CHARMM36M, мембраны размером 6x6x8 нм, содержащие 50 молекул ХОЛ и 16 молекул флавона и 120 молекул ДОФХ и 12 молекул флавона или 100 молекул ДОФХ в буферном растворе 0.1 М КСl. Время моделирования каждой системы составляло 100 нс.

Было показано, что лютеолин уменьшает ГП липидных мембран на 100 мВ, а в присутствии байкалеина максимальное изменение ГП бислоев порядка 30 мВ. Исключение ХОЛ из состава мембраны демонстрирует, что уменьшение ГП при адсорбции лютеолина

составляет около 115 мВ, а в присутствии байкалеина наблюдается увеличение этого параметра до 35 мВ. В изменении дипольной компоненты ГП мембраны важной характеристикой является проекция дипольного момента молекул флавонов на нормаль к плоскости бислоя. Согласно данным молекулярного моделирования, проекция дипольного момента лютеолина на ДОФХ/ХОЛ и ДОФХ мембрану составляет около 2.1 и 2.0 Д, а в случае байкалеина эта величина около 0.1 и -0.3 Д соответственно. Полученные результаты методом молекулярного моделирования подтверждают, что изменения дипольного потенциала бислоев зависят от ориентации и проекции вектора дипольного момента молекул флавонов в бислое. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-15-00417.

ЭМФОРИН: МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НОВОГО БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА ПЕПТИДАЗ СЕМЕЙСТВА M4

Бердышев И.М.*, Чухонцева К.Н., Карасева М.А.,
Демидюк И.В.

*Национальный исследовательский центр «Курчатовский
институт», Москва, Россия
E-mail*: igorgetu@mail.ru*

Белковые ингибиторы металлопротеаз (БИМ) активно исследуются как потенциальные терапевтические агенты. В условиях увеличивающейся антибиотикорезистентности бактерий они представляют перспективную альтернативу низкомолекулярным ингибиторам, имеющим низкую селективность. При этом механизмы действия БИМ остаются малоизученными. Недавно нами был охарактеризован эмфорин (M4in) – прототип нового семейства БИМ (I104 по MEROPS), обнаруженный у бактерии *Serratia proteamaculans*. M4in ингибирует металлопротеазы семейства M4, а его природной мишенью является протеализин (PIn), металлопротеаза *S. proteamaculans*. Эмфориноподобные ингибиторы (ЭПИ) могут послужить основой для разработки высокоселективных терапевтических ингибиторов пептидаз M4,

известных факторов бактериального патогенеза, например, при инфекции *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

Анализ пространственных структур M4in и PIn, последовательностей ЭПИ, модели комплекса M4in-PIn, позволил выдвинуть гипотезу о молекулярном механизме действия M4in, которая была проверена с помощью сайт-направленного мутагенеза. Было показано, что две пространственно-сближенные гибкие петлевые области имеют решающее значение для взаимодействия M4in-PIn. В первой ключевым элементом является остаток Asp70, который координирует каталитический цинк фермента. Во второй гидрофобные остатки (Phe21, Ala22, Phe23) соответствуют субстратной специфичности металлопротеазы и взаимодействуют с S' сайтами (обозначение по Schechter и Berger, 1967).

У большинства БИМ координирование Zn^{2+} и вытеснение каталитической воды лежит в основе механизма ингибирования. Однако чаще это осуществляется N- или C-концевыми остатками, а не боковой группой неконцевой аминокислоты, как у M4in. Такой вариант часто встречается у пропептидов металлопротеаз, но показан только для двух автономных БИМ астацинового семейства: фетуина-В и сиззлед. В обоих белках Zn^{2+} также координируется остатком Asp, однако их структуры и взаимодействия с металлопротеазами отличаются от M4in. Механизм действия M4in является уникальным для ингибиторов пептидаз M4, что открывает перспективы для разработки антибактериальных средств нового поколения.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОВОДЯЩИХ СВОЙСТВ
ЭНДОГЕННЫХ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАНАЛОВ
PIEZO1 В КЛЕТКАХ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИИ
ЧЕЛОВЕКА K562**

**Васильева В.Ю.^{1*}, Сударикова А.В.¹, Лысикова Д.В.¹,
Хайруллина З.М.¹, Кириллова П.И.^{1,2}, Морачевская Е.А.¹,
Чубинский-Надеждин В.И.¹**

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: yvasileva@incras.ru*

Piezo1 – это кальций-проводящий механочувствительный канал, который участвует во множестве ключевых клеточных реакций как в норме, так и при патологиях. В 2015 году был обнаружен селективный химический низкомолекулярный активатор каналов Piezo1 – вещество Yoda1, которое способно стимулировать активность Piezo1 в отсутствие механических стимулов. Это позволяет использовать Yoda1 в качестве удобного инструмента для изучения фундаментальных механизмов функционирования и роли каналов Piezo1 в клеточных процессах. В настоящей работе для исследования проводящих свойств Piezo1 были использованы клетки миелоидной лейкемии человека линии K562 как уникальный объект для регистрации одиночных токов при отведении от плазматической мембраны всей клетки (конфигурация whole-cell метода патч-кламп). Была определена минимальная концентрация Yoda1 (1 мкМ), достаточная для активации одиночных каналов Piezo1, что и было использовано для решения экспериментальных задач. С помощью варьирования ионного состава экспериментальных растворов была изучена унитарная проницаемость эндогенных каналов Piezo1 для основных физиологически значимых катионов (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}). С помощью регистрации одиночных токов и флуоресцентных измерений концентрации внутриклеточного Mg^{2+} была показана принципиальная возможность участия Piezo1 в транспорте Mg^{2+} и Mg^{2+} -зависимых внутриклеточных процессах. Впервые было

показано, что антибиотик гентамицин эффективно блокирует активность Yoda1-индуцированных Piezo1 по механизму блока “открытой поры” (open channel block). Этот подход может быть использован для быстрого подавления активации Piezo1 и имеет очевидное преимущество перед другими неселективными блокаторами Piezo1, действующими на липидное микроокружение каналов. Совокупность результатов указывает на перспективность использования клеток K562 в качестве экспериментальной модели для тестирования действия различных веществ - потенциальных модуляторов Piezo1 на эндогенные ионные каналы в плазматической мембране.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-74-10037).

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЭХИНОКАНДИНОВ В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

**Водопьянова Е.В.*, Малыхина А.И., Ефимова С.С.,
Остроумова О.С.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: ket08_02@mail.ru*

Инвазивные микозы являются серьезной проблемой в сфере здравоохранения многие десятилетия. Одними из наиболее эффективных антимикотиков считаются эхинокандины (ЭК), которые подавляют рост грибов, нарушая работу фермента, синтезирующего ключевой компонент клеточной стенки. Точный механизм действия ЭК дискуссионный, а в последнее время появляются сведения, позволяющие предполагать непосредственное взаимодействие ЭК с клеточными мембранами.

Целью работы являлось исследование способности ЭК – анидулафунгина (АНФ), каспофунгина (КСФ) и микафунгина (МКФ) – влиять на проницаемость плоских липидных бислоев, моделирующих мембраны клеток млекопитающих и грибов.

Использовали электрофизиологический метод регистрации токов, протекающих через бислои в режиме фиксации потенциала.

Липидные мембраны формировали по методу Монтала и Мюллера (Montal and Mueller, 1972) из 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) и эргостерина (Эрг) или холестерина (Хол) в молярном соотношении 2:1 в растворах с 6-кратным градиентом концентрации электролита – 0.025 М (*цис*-отсек) и 0.15 М (*транс*-отсек) NaCl, pH = 7.4. АНФ, КСФ и МКФ вводили в *цис*-отсек камеры в концентрациях от 0.5 до 3 мкМ. Селективность ЭК-индуцированных пор определяли в соответствии со значением числа переноса катионов и/или анионов.

Установлено, что АНФ, КСФ и МКФ образуют ион-проводящие поры в стерин-содержащих мембранах. Значение числа переноса катионов в ПОФХ:Эрг мембранах составило 0.7 ± 0.1 , 0.4 ± 0.1 , 0.6 ± 0.1 , а в ПОФХ:Хол – 0.8 ± 0.1 , 0.4 ± 0.1 , 0.6 ± 0.1 для АНФ, КСФ, МКФ, соответственно. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что АНФ и МКФ формируют слабо катион-селективные поры, а КСФ – слабо анион-селективные. Сравнение химических структур ЭК и их способности формировать поры с различной селективностью позволило предположить, что различия в селективности ЭК-пор могут быть обусловлены различиями в заряде молекул АНФ, КСФ и МКФ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-74-10023.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ТРАНСМЕМБРАННОМ ДОМЕНЕ НА АКТИВАЦИЮ РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА (IGF-IR)

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

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

² *Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шелякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

E-mail: gavrilenkova.aa@phystech.edu*

Рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR) — это рецепторная тирозинкиназа, которая активируется инсулиноподобным фактором роста 1 и 2, а также инсулином. IGF-

IR играет ключевую роль в росте, дифференцировке и старении клеток. На данный момент точные механизмы активации и передачи внутриклеточного сигнала семейства рецепторов инсулина неизвестны. Предполагается, что в неактивном состоянии ТМ-домены рецептора инсулиноподобного фактора роста находятся в конформации, препятствующей взаимодействию цитоплазматических частей молекулы. При связывании лиганда, конформация рецептора меняется, в результате тирозинкиназные домены сближаются и фосфорилируют друг друга, вызывая клеточный ответ.

Чтобы изучить роль трансмембранного домена в активации рецептора IGF-IR, нами были получены мутантные формы рецептора, содержащие двойные замены в ТМ-доме. Клетки линии HEK293 трансфицировали плазмидными конструкциями, кодирующими мутантные формы IGF-IR с заменами V941E-A942R; V948E-G949R; G949E-G950R. Затем клетки инкубировали в среде F-12, с добавлением инсулина, клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота. В результате эксперимента мы получили следующие данные. Мутантные формы IGF-IR V941E-A942R и V948E-G949R не экспрессировались в клеточной линии HEK293. Двойная замена G949E-G950R приводила к фосфорилированию рецептора в отсутствие лиганда в отличие от рецептора дикого типа. Мы предполагаем, что двойная замена G949E-G950R приводит к стабилизации димера рецептора в активной конформации, за счет образования солевых мостиков в трансмембранном домене, и к дальнейшему автофосфорилированию.

Исходя из полученных данных, мы можем сделать вывод о том, что трансмембранный домен играет важную роль в активации IGF-IR, и даже точечные замены в его аминокислотной последовательности, могут приводить к изменению характера активации рецептора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-74-00024).

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА

Герда Б.А.^{1*}, Волкова А.А.¹, Добрылко И.А.¹, Бондаренко С.С.²,
Гамбарян С.П.¹, Миндукшев И.В.¹

¹ *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М.
Сеченова, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский государственный технологический
институт (технический университет), Санкт-Петербург,
Россия*

E-mail: bgerda2525@gmail.com*

Актуальность. Гемостаз – агрегация тромбоцитов и образование фибринового сгустка при повреждении сосуда. Тромбоз – образование тромба в неповрежденном сосуде, часто приводящее к инсультам, инфарктам и тромбоэмболиям. Оба процесса включают одинаковые сигнальные молекулы, что затрудняет их разделение. Противотромботическая терапия может вызвать кровотечения, поэтому актуально создание новых препаратов, которые бы ингибировали тромбоцитарную активность без нарушения общего гемостаза. Математическая модель гемостаза поможет отслеживать эффекты лекарств и создаст основу для более специфичной терапии. Выделяя ключевые фенотипы тромбоцитов и их реакции, мы предлагаем феноменологический подход, который позволит изучить кинетику реакций гемостаза и в дальнейшем создать более комплексную модель.

Материалы и методы. Для исследования кинетики ключевых реакций клеточного гемостаза использовали новую аналитическую платформу LaSca (Биомедсистем, Санкт-Петербург), сочетающую методы лазерной дифракции и флуоресцентного анализа. Максимальные значения констант скоростей рассчитаны при концентрациях насыщения соответствующих агонистов и антагонистов. На текущем этапе оценивали ADP в качестве агониста и илопрост (аналог простаглицлина) в качестве антагониста. При написании модели и нахождении решений системы дифференциальных уравнений использовали модуль SciPy для языка Python.

Результаты. Разработана математическая модель тромбоцитарного гемостаза, включающая 4 основных реакции (от shape change до clot reaction), коагуляцию, распад на микрочастицы, десенсибилизацию, ингибирование (Уравнение 1). Рассчитаны максимальные значения констант скоростей. Определены зависимости доза-эффект для воздействия ADP и илоprostа.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dN_{rest}}{dt} = k_{21}N_{inh} + k_{11}N_{dsen} - k_{12}N_{rest} - k_1N_{rest} \\ \frac{dN_{sph}}{dt} = k_1N_{rest} - k_2N_{sph} - k_5N_{sph} - k_8N_{sph} \\ \frac{dN_{gp}}{dt} = k_2N_{sph} - k_3N_{gp}^2 - k_6N_{gp} \\ \frac{dN_{aggr}}{dt} = k_3N_{gp}^2 - k_4N_{aggr} - k_7N_{aggr} \\ \frac{dN_{dsen}}{dt} = k_5N_{sph} + k_6N_{gp} + k_7N_{aggr} - k_{11}N_{dsen} \\ \frac{dN_{clot}}{dt} = k_4N_{aggr} + k_{10}N_{coag} \\ \frac{dN_{coag}}{dt} = k_8N_{sph} - k_9N_{coag} - k_{10}N_{coag} \\ \frac{dN_{ing}}{dt} = k_{12}N_{rest} - k_{21}N_{inh} \\ \frac{dN_{mp}}{dt} = k_9N_{coag} \end{array} \right. , \quad (1)$$

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 23-15-00142.

ХЛОРИД ЛИТИЯ ВЫЗЫВАЕТ АКТИВАЦИЮ АУТОФАГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ГЕПАТОЦИТАХ ПЕЧЕНИ МЫШИ

Гиниятуллина Д.М.^{1*}, Пономарева А.А.², Дмитриева С.А.²

¹ Казанский Федеральный (Приволжский) Университет,
Казань, Россия;

² Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ
РАН, Казань, Россия

E-mail*: dianamaratovna61@gmail.com

Аутофагия вовлечена в патогенез различных заболеваний печени, как важный механизм, ответственный за своевременное удаление

липидных капель, а также поврежденных и окисленных клеточных компонентов и макромолекул. В связи с этим активация аутофагии в настоящее время рассматривается в качестве многообещающего подхода при лечении различных заболеваний печени. В настоящей работе было проанализировано влияние LiCl на изменение редокс-метаболизма и активацию аутофагии в тканях печени мыши.

Исследование проводилось на трехмесячных самцах белых лабораторных мышей и было одобрено комиссией по биоэтике ФИЦ КазНЦ РАН (№ 23-1/23-2/2 от 28 февраля 2023 г). Аутофагию индуцировали 3-дневным пероральным введением LiCl (0,015 г/кг), действие которого в качестве индуктора аутофагии на тканях печени в условиях *in vivo* практически не изучалось. Активация аутофагии при действии лития является mTOR-независимой и обусловлена ингибированием инозитолмонофосфатазы, что приводит к истощению свободного инозитола и последующему падению уровней мио-инозитол-1,4,5-трифосфата. В наших экспериментах применение LiCl привело к значительному увеличению в гепатоцитах печени количества аутофагосом, а также к существенным перестройкам ультраструктуры митохондрий и эндоплазматического ретикулула. В клетках выявлялись аутофагосомы на разных этапах формирования. При этом часть аутофагосом содержала митохондрии и каналцы эндоплазматического ретикулула. Данные изменения при этом не приводили к существенным изменениям редокс-метаболизма, и сопровождалась лишь незначительным увеличением активности супероксиддисмутазы. Таким образом, пероральное применение LiCl приводит к существенным изменениям в ультраструктуре митохондрий и эндоплазматического ретикулула и активирует их аутофагическую деградацию в гепатоцитах печени. Мы предполагаем, что при действии LiCl важную роль могут играть как его антиоксидантные свойства, в том числе направленные на предотвращение повреждения митохондрий в гепатоцитах печени, так и активация общей/селективной (митофагия и ретикулофагия) аутофагии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-20086.

**УЧАСТИЕ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫХ КАНАЛОВ ORAI В
РЕГУЛЯЦИИ КАЛЬЦИЙ-АКТИВИРУЕМЫХ ХЛОРНЫХ
КАНАЛОВ ANO6 В КЛЕТКАХ HEK293T**

**Григорьева Е.Р.*, Решетин Д.С., Колесников Д.О.,
Глушанкова Л.Н., Скобелева К.В., Казначеева Е.В.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: roma.grigorev.75@mail.ru*

ANO6 (TMEM16F) входит в семейство аноктаминов, кальций-зависимых хлорных каналов (CaCC). Он является белком двойной функции, совмещает в себе свойства ионного канала и фосфолипидной скрамблазы. ANO6 экспрессируется повсеместно в организме человека. Пути активации каналов ANO6 изучены недостаточно, в основном опираясь на косвенные данные и системы с оверэкспрессией.

Депо-управляемый вход кальция является одним из основных источников кальция в электронеозбудимых клетках. Его основные участники – сенсоры STIM на мембране эндоплазматического ретикулума и депо-управляемые каналы Orai. Нарушение работы депо-управляемых каналов и ANO6 приводит к формированию сходных патологий.

Целью работы было изучение регуляции эндогенных ANO6 депо-управляемым входом кальция в клетках HEK293T.

Опыты с оверэкспрессией и нокдауном ANO6 в клетках HEK293T показали, что CaCC сформированы белками ANO6. На уровне тока через отдельные каналы и при отведении тока от целой клетки показали, что активность эндогенных ANO6 зависит от опустошения кальциевого депо.

Используя мутантные белки STIM и Orai, а также селективные ингибиторы депо-управляемых каналов Orai, мы установили функциональное сопряжение активации эндогенных каналов Orai и ANO6 в клетках HEK293T.

Таким образом, активность эндогенных ANO6 зависит от входа кальция через депо-управляемые каналы Orai.

Работа была поддержана грантом РФФ № 23-44-00054.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АТФ С
АМИЛОИДНЫМИ ФИБРИЛЛАМИ НА ОСНОВЕ
ЛИЗОЦИМА**

**Гридасова К.Ж.* , Степаненко Олеся В., Сулацкий М.И.,
Сулацкая А.И., Степаненко Ольга В.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: krgridasova@yandex.ru*

Старение клеток сопровождается целым спектром событий, к которым относится формирование патологических упорядоченных белковых агрегатов – амилоидных фибрилл. Накопление амилоидных фибрилл является маркером таких серьезных заболеваний, как локальные и системные амилоидозы и нейродегенеративные заболевания. В последнее время прослеживается тенденция к заметному росту числа и омоложению этих заболеваний. Однако эффективных лекарственных средств для антиамилоидной терапии до сих пор не существует.

Было показано, что наряду с амилоидогенезом старение клеток сопровождается снижением синтеза АТФ. Известно, что АТФ, обладая гидротропными свойствами, может стабилизировать белок и напрямую препятствовать его агрегации. Выявлена способность АТФ моделировать процесс формирования амилоидных фибрилл на основе ряда амилоидогенных пептидов. При этом слабо изучено взаимодействие АТФ со зрелыми амилоидными фибриллами.

Для решения этой актуальной проблемы нами было проанализировано влияние АТФ на структуру и свойства зрелых амилоидов. В качестве объекта исследования были выбраны амилоидные фибриллы на основе лизоцима, накапливающиеся в организме при наследственном системном лизоцимовом амилоидозе. Амилоидная природа полученных белковых агрегатов была подтверждена микроскопическими, спектроскопическими и физико-химическими методами. Анализ спектров кругового дихроизма в ближней УФ-области и зависимостей Скэтчарда для образцов амилоидных фибрилл в присутствии АТФ, подготовленных методом равновесного микродиализа, позволил доказать взаимодействие амилоидных

фибрилл на основе лизоцима с молекулами АТФ. При этом были выявлены различия в характере взаимодействия АТФ с лизоцимом в агрегированной форме по сравнению с глобулярным лизоцимом. Анализ данных, полученных методом электронной микроскопии, и мутности образцов позволил показать, что в присутствии АТФ в концентрации микромолярного порядка фибриллярные волокна становятся менее плотными, а размер образованных ими сгустков уменьшается. Полученные результаты имеют существенное значение для установления причин усугубления амилоидозов при старении клетки и разработки подходов к терапии этих заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 23-74-10092).

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ
СИРИНГОПЕПТИНА 22А, ЛИПОПЕПТИДА ИЗ
PSEUDOMONAS SYRINGAE, В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ,
ИМИТИРУЮЩИХ ВНЕШНЮЮ МЕМБРАНУ
МИКОБАКТЕРИЙ**

**Зарипов И.И.*, Злодеева П.Д., Ефимова С.С.,
Остроумова О.С.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: ilyas-z05@mail.ru*

Мембраноактивный циклический липопептид сирингопептин 22А (СП22А), продуцируемый бактерией *Pseudomonas syringae*, обладает цитотоксическим действием, в том числе в отношении микобактерий (Grgurina et al., 2005). Заболевание, вызываемое *Mycobacterium tuberculosis*, является одним из самых опасных в мире и приводит к большому числу смертей. Внешняя липидная мембрана *M. tuberculosis* содержит уникальные миколовые кислоты (МК), которые стабилизируют клеточную стенку микобактерии и обеспечивают ее низкую проницаемость для различных антибиотиков (Stodola et al., 1938; Jarlier and Nikaido, 1994). Поэтому актуален поиск агентов, действующих на клеточную стенку микобактерий.

Целью работы являлось исследование порообразующей активности СП22А в плоских липидных бислоях, моделирующих внешнюю

мембрану микобактерий. Липидные бислои были сформированы по методу Монтала и Мюллера (Montal and Mueller, 1972) из чистого 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфо-1'-*rac*-глицерина (ПОФГ) и смесей ПОФГ и метокси-миколовой кислоты (мМК) (80/20 мол.%) и ПОФГ и кето-миколовой кислоты (кМК) (80/20 мол.%) в растворе 0.1 М КСl (рН 7.4).

Обнаружено, что добавление СП22А с одной стороны ПОФГ-мембраны до концентрации 0.20 мкг/мл приводит к формированию одиночных каналов с амплитудой тока -0.65 ± 0.04 пА при трансмембранном напряжении - 150 мВ. Добавление СП22А с одной стороны мембраны, сформированной из смеси ПОФГ/кМК или ПОФГ/мМК, при том же трансмембранном напряжении приводит к появлению каналов при концентрации 0.08 мкг/мл и 0.14 мкг/мл соответственно. При этом амплитуда тока, протекающего через каналы, образованные СП22А, составляет -0.83 ± 0.03 пА и -0.96 ± 0.05 пА в ПОФГ/кМК и ПОФГ/мМК мембранах соответственно.

Таким образом, можно заключить, что амплитуда трансмембранного тока, протекающего через СП22А канал, не зависит от наличия в составе липидного бислоя специфических адъювантов микобактерий. При этом можно думать, что СП22А проявляет большую активность в мембранах, содержащих МК, чем в чистых ПОФГ бислоях, что выражается в снижении минимальной концентрации порообразования в 2.5 и 1.5 раза для ПОФГ/кМК и ПОФГ/мМК бислоев соответственно. Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РФФ № 22-15-00417.

УВЕЛИЧЕНИЕ ФЛАВОНОИДАМИ ИОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ БИСЛОЕВ, МОДЕЛИРУЮЩИХ ВНЕШНЮЮ МЕМБРАНУ МИКОБАКТЕРИЙ

Злодеева П.Д.* , Ефимова С.С., Остроумова О.С.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: zlodeeva.pd@yandex.ru*

Клеточная оболочка *Mycobacterium tuberculosis* является барьером для противотуберкулезных соединений. Поиск агентов, способных увеличивать проницаемость клеточной стенки микобактерий для

доставки противотуберкулезных средств, является актуальной задачей. Известно, что флавоноиды обладают антибактериальным действием, ингибируя рост *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* самостоятельно или в сочетании с известными противотуберкулезными препаратами (Mativandlela et al., 2009, Garg et al., 2022). В работе исследована способность флавоноидов, апигенина, кверцетина и таксифолина, изменять ионную проницаемость бислоев, сформированных из фосфатидилглицерина (ФГ) и имитирующих по составу мембраны бактериальных клеток. Для установления роли липидов, конъюгированных с трегалозой, которые присутствуют в составе внешней мембраны микобактерий, на активность флавоноидов в состав липидной мембраны вводили моноолеат трегалозы (ТГО).

С помощью метода дифференциальной сканирующей микрокалориметрии было исследовано влияние флавоноидов на плотность упаковки липидов ФГ в мембране. Таксифолин, кверцетин и апигенин способны снижать температуру главного перехода ФГ на 0.7, 1.2 и 1.4 °С и увеличивать ширину пика плавления на 1.3, 1.0 и 4.0 °С, соответственно, что указывает на их разупорядочивающее действие. Анализ липофильности молекул флавоноидов позволил сделать заключение, что гидрофобные флавоноиды способны сильнее снижать температуру плавления липида, чем гидрофильные аналоги из-за их способности интеркалировать в липидных бислоях.

Электрофизиологическим методом исследовано влияние флавоноидов на ионную проницаемость плоских липидных мембран, сформированных из чистого ФГ и смеси ФГ/ТГО (80/20 мол.%). Обнаружено, что флавоноиды апигенин, таксифолин и кверцетин снижают проницаемость липидных мембран, обогащенных ТГО, при концентрациях на порядок ниже, чем в случае ФГ-бислоев. Полученные результаты позволяют сделать предположение, что флавоноиды таким образом способны снижать проницаемость внешней мембраны микобактерий для транспорта лекарственных соединений к внутренней мембране микобактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-15-00417).

**ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДА КЕМПФЕРОЛА НА
ПРОДУКЦИЮ МДА В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ
И МОЗГЕ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ**

Йулдошев Б.Г.*, Эргашев Н.А., Комилов Э.Ж., Асраров М.И.

*Институт биофизики и биохимии при НУУз, Ташкент,
Узбекистан*

E-mail: nuraliergashev79@gmail.com*

Изучение процессов перекисного окисления липидов имеет большое практическое значение при различных патологиях. Возникновение липопероксидации в биологических мембранах приводит к нарушению окислительно-восстановительных процессов в клетках. В связи с этим мы изучали влияние флавоноида кемпферола на продукцию малонового диальдегида (МДА) в тканях поджелудочной железы и мозга на моделях животных, окислительный стресс (ОС) вызывали аллоксангидратом.

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах. Животные I группы были взяты в качестве контроля. В группах II, III и IV подкожно вводили аллоксангидрат, растворенный в цитратном буфере (рН 4.0), в дозе 150 мг/кг для индукции ОС. При этом животным в III и IV группах в течение 10 дней с первого дня вводили *per os* кемпферол в дозе 10 мг/кг (III гр.) и 50 мг/кг (IV гр.). На 11-е сутки эксперимента животных подвергали эвтаназии путем декапитации, выделяли ткани поджелудочной железы и мозга, готовили гомогенат ткани в соотношении 1/10 в буферном растворе 50 мМ трис-НСl (рН 7.4) и определяли количество в них МДА.

Было установлено, что количество МДА у контрольных животных составляло 10.9 ± 1.4 мкМ/мг в ткани поджелудочной железы и 11.8 ± 1.9 мкМ/мг ткани в мозге. Во II группе количество МДА в ткани поджелудочной железы составляло 22.7 ± 1.6 мкМ/мг ткани, а в ткани мозга 22.2 ± 1.4 мкМ/мг. У животных III группы, которым перорально вводили 10 мг/кг кемпферола, количество МДА в поджелудочной железе составляло 18.4 ± 1.4 мкМ/мг ткани, тогда как в ткани мозга этот показатель составил 15.8 ± 1.4 мкМ/мг. У животных IV группы, которым перорально вводили кемпферол в

дозе 50 мг/кг, количество МДА в тканях поджелудочной железы и мозга составляло 13.0 ± 1.5 мкМ/мг и 13.8 ± 1.7 мкМ/мг ткани соответственно. Видно, что количество МДА в тканях поджелудочной железы и мозга животных, подвергнутых ОС аллоксангидратом, увеличилось в 2.1 и 1.9 раза соответственно.

При этом коррекция ОС кемпферолом в дозе 10 мг/кг снижала выработку МДА на 18.9 и 28.8% соответственно по сравнению с ОС, а в дозе 50 мг/кг вызывала снижение МДА на 42.7 и 37.8% соответственно по сравнению с ОС. По-видимому, флавоноид кемпферол лучше предотвращает ОС в экспериментах *in vivo* при концентрации 50 мг/кг, нежели 10 мг/кг.

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ ПРИ ИХ ДЛИТЕЛЬНОМ ИНКУБИРОВАНИИ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

**Кайда А.А.* , Сулацкий М.И., Степаненко Ольга В., Степаненко
Олеся В., Михайлова Е.В., Сулацкая А.И.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: arina.nurova@gmail.com*

Накопление упорядоченных белковых агрегатов, амилоидных фибрилл, приводит к нарушению функционирования органов и тканей при различных заболеваниях (таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, AL-, AA- и гемодиализный амилоидозы и др.). Несмотря на тяжесть этих заболеваний и значительной ежегодный рост числа пациентов, страдающих амилоидозами, эффективной и безопасной антиамилоидной терапии до сих пор не существует.

В качестве модельных объектов для разработки антиамилоидных препаратов *in vitro* зачастую используют свежеприготовленные амилоидные фибриллы. Однако было установлено, что амилоиды высокостабильны и благодаря этому длительное время присутствуют в организме человека. При этом вопрос о том, изменяются ли структура и свойства персистирующих фибрилл, до сих пор остается открытым.

Для ответа на этот вопрос нами были исследованы амилоиды на основе лизоцима (накопление которых приводит к системному лизоцимовому амилоидозу), в процессе их длительного инкубирования (от нескольких месяцев до года) при физиологической температуре. Результаты, полученные с применением спектроскопических, микроскопических, электрофоретических и колориметрических методов, позволили выявить изменения в структуре, стабильности и цитотоксичности инкубируемых амилоидов.

Обнаруженные изменения свидетельствуют о том, что при проведении экспериментов *in vitro* потенциальные терапевтические средства необходимо тестировать не только на свежеприготовленных фибриллах, но и на более «зрелых» амилоидах. В связи с этим отобранные через разные промежутки времени и охарактеризованные амилоидные фибриллы в дальнейшем планируется использовать в качестве модельных объектов для выявления устойчивости фибрилл различной степени «зрелости» к воздействию внешних факторов, а также механизмов и эффективности деградации амилоидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 23-74-10092).

СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Карташова А.Д.^{1*}, Плотникова Л.В.¹ Поляничко А.М.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-
Петербург, Россия

E-mail*: st076251@student.spbu.ru

Работа посвящена разработке скрининговой методики, направленной на выявление признаков множественной миеломы (ММ) на основе анализа спектров ИК-поглощения образцов

сыворотки крови. В настоящее время ИК-спектроскопия является одним из перспективных подходов для проведения первичной диагностики различных заболеваний благодаря относительной простоте получения спектров и их высокой информационной насыщенности.

В работе получены и проанализированы спектры ИК-поглощения образцов сыворотки крови 21 здорового донора, 31 больного ММ. Спектры были получены методом ИК-спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) без предварительной пробоподготовки. При анализе спектров ИК-поглощения для оценки вторичной структуры исследуемых образцов проводилась декомпозиция полосы Амид I с помощью анализа спектра второй производной.

Было показано, что используемый подход позволяет разделить группы здоровых доноров и пациентов с секретирующей формой ММ по содержанию α -спиральных участков и β -структур во вторичной структуре образцов. Полученные количественные критерии разделения образцов по признаку наличия или отсутствия патологического белка. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что предложенный подход пригоден для выявления признаков ММ при условии наличия парапротеина в образцах сыворотки крови. В работе также обсуждается применимость подхода для выявления признаков иных патологий.

Часть работы выполнена с использованием оборудования ресурсных центров научного парка СПбГУ («Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Центр диагностики функциональных материалов для медицины фармакологии и нанoeлектроники», «Криогенный отдел»).

Образцы для исследования были получены сотрудниками Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии (Санкт-Петербург, Россия).

**БЕЛКИ ORAI ФОРМИРУЮТ В КЛЕТКАХ НЕК293
ЭНДОГЕННЫЕ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЕ КАНАЛЫ РАЗНОЙ
ПРОВОДИМОСТИ**

**Колесников Д.О.* , Григорьева Е.Р., Гусев К.О.,
Глушанкова Л.Н., Шалыгин А.В., Казначеева Е.В.**

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: koledmi3@mail.ru*

Депо-управляемый вход является одним из наиболее универсальных и важных путей поступления ионов кальция в клетку. Ключевую роль в данном процессе играют депо-управляемые каналы CRAC, образованные белками Orai. Эти каналы характеризуются очень высокой селективностью по отношению к ионам кальция и чрезвычайно низкой проводимостью, что не позволяет регистрировать токи через данные каналы на уровне одиночных каналов. Тем не менее, работы последних лет указывают, что депо-управляемые каналы, сформированные белками Orai, в определенных условиях могут формировать каналы с большей проводимостью.

Ранее в модельных клетках НЕК293 были описаны высоко селективные по отношению к кальцию депо-управляемые каналы I_{min}, чей молекулярный состав оставался не изучен. При этом проводимость каналов I_{min} выше, чем CRAC, что позволяет регистрировать их ток даже на уровне одиночных каналов. Используя метод локальной фиксации потенциала, мы сравнили электрофизиологические свойства эндогенных депо-управляемых каналов I_{min} и CRAC в модельных клетках НЕК293, изучили как подавление активности каналов Orai влияет на каналы I_{min}, а также эффект мутаций, связанных с порой канала Orai, на проводимость данных каналов.

Результаты нашего исследования указывают, что эндогенные каналы I_{min} сформированы белками Orai. Таким образом, мы показали, что эндогенные каналы Orai могут формировать каналы разной проводимости. Полученные нами данные помогают понять, как один и тот же кальциевый канал может формировать широкий спектр внутриклеточных сигналов.

Работа была поддержана грантом РФФ № 23-44-00054.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ДИНАМИКИ S-БЕЛКА
ДЕЛЬТА ВАРИАНТА SARS-COV-2 В КОМПЛЕКСЕ
С НАНОАНТИТЕЛАМИ**

**Кочаровская М.В.^{1,2*}, Иванников А.Д.^{1,2}, Борщевский В.И.¹,
Дормешкин Д.О.³, Шапиро М.А.³, Шенкарев З.О.^{1,2},
Люкманова Е.Н.^{1,2,4,5}**

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

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

³ *Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск,
Беларусь*

⁴ *Московский государственный университет им. М.В.
Ломоносова, Москва, Россия*

⁵ *Биологический факультет, Шэньжэньский университет
МГУ-ППИ, Шэньжень, Китай*

E-mail: kocharovskaya.mv@phystech.edu*

Вирус SARS-CoV-2 является возбудителем острого респираторного заболевания COVID-19, вызвавшего пандемию. Одним из возможных способов лечения COVID-19 является использование нейтрализующих антител. Антитела, связываясь с S-белком вируса, предотвращают проникновение SARS-CoV-2 в клетки человека и препятствуют распространению вируса в организме. В этой работе в качестве нейтрализующего антитела использовались наноантитела — вариабельные домены тяжелой цепи антител (VHH). Высокая аффинность и стабильность наноантител делает их многообещающими кандидатами на роль лекарственных средств для терапии различных заболеваний.

В работе была исследована структура комплекса S-белка с наноантителами методом криоэлектронной микроскопии. Структура S-белка в состоянии с двумя рецепторсвязывающими доменами (RBD) в положении “up” и одним в положении “down” была получена с разрешением 2.94 Å. Локальный рефайнмент RBD доменов с антителами позволил получить разрешение порядка 4 Å в

этих областях структуры. Таким образом были выявлены два не перекрывающихся сайта взаимодействия исследуемого наноантитела с RBD доменом S-белка. Кроме того, была изучена гетерогенность комплекса и описана высокая подвижность RBD доменов исследуемого белка. Полученные структуры позволили описать сайты связывания наноантитела с S-белком, а также интерфейс взаимодействия наноантител друг с другом в димерной форме. Полученные данные могут быть использованы для получения новых синтетических антител, направленных на лечение COVID-19.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP70
С МОДЕЛЬНЫМИ ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ**
**Лихоманова Р.Б.^{1,2*}, Ефимова С.С.¹, Ищенко А.М.³, Жахов А.В.³,
Шевцов М.А.^{1,2}, Остроумова О.С.¹**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Центр персонализированной медицины «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: tagaeva97@yandex.ru*

Мембранно-связанная форма белка теплового шока Hsp70 является перспективной мишенью для тераностики злокачественных новообразований, благодаря своей специфической локализации на плазматической мембране опухолевых, но не нормальных, клеток. Точный механизм заякоревания белка в липидном бислое и его функции в мембране все еще не до конца изучены. В настоящей работе исследовали взаимодействие рекомбинантного Hsp70 с модельными липидными мембранами различного состава. Используя дифференциальную сканирующую микрокалориметрию, показали, что Hsp70 взаимодействует с отрицательно заряженным фосфатидилсерином (ФС) и не проявляет такой активности в нейтральном фосфатидилхолине. В результате чего формируется

интердигитационная фаза, характеризующаяся уменьшением толщины мембраны и увеличением плотности упаковки липидов. Такая Hsp70-индуцированная интердигитация ФС-содержащих доменов может влиять на резистентность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам за счет повышения жесткости мембраны и снижения ее проницаемости. Результаты конфокальной флуоресцентной микроскопии показали, что добавление Hsp70 к флуоресцентно-меченым везикулам, сформированным из смеси 80 мол.% пальмитоилолеоилфосфатидилхолина и 20 мол.% дипальмитоилфосфатидилсерина, приводит не только к увеличению количества фазово-разделенных липосом, но и к увеличению площади упорядоченной фазы, образованной преимущественно молекулами ФС. Это свидетельствует о способности белка избирательно связываться с ФС-содержащими упорядоченными доменами в мембране липосом и стабилизировать их, вероятно, за счет уменьшения гидрофобного несоответствия, возникающего на границе раздела фаз. Более детальный анализ функций мембранно-ассоциированного Hsp70 позволит выявить роль белка в патогенезе опухоли, а также раскрыть механизмы устойчивости клеток к противоопухолевым агентам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

РОЛЬ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В РЕГУЛЯЦИИ КАНАЛОВ ENaC, АКТИВИРУЕМЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫМ ПРОТЕОЛИЗОМ

**Лысикова Д.В.* , Васильева В.Ю., Чубинский-Надеждин В.И.,
Сударикова А.В.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

E-mail: d.lysikova@outlook.com*

Натриевые каналы ENaC (epithelial Na⁺ channels) опосредуют быстрые изменения натриевой проницаемости в невозбудимых клетках и, тем самым, запуская различные сигнальные каскады,

способны влиять на их пролиферативный и инвазивный потенциал. Всё больше данных указывает на то, что актиновый цитоскелет, опосредующий активность ионных каналов, может представлять собой «точку схождения» различных сигнальных путей. Ранее в клетках лейкемии человека K562 были охарактеризованы амилорид-нечувствительные каналы ENaC, которые были названы актин-управляемыми из-за их механизма активации/инактивации, связанного с разборкой/сборкой примембранного актина. Также был выявлен внеклеточный механизм регуляции актин-управляемых каналов протеазой трипсин (активатором классических ENaC). Остается нерешенным вопрос об аддитивности стимулирующего действия внеклеточного протеолиза и разборки актинового цитоскелета.

Для оценки роли фибриллярного (F)-актина в функционировании натриевых каналов, активированных при протеолитическом расщеплении, были проведены эксперименты на изолированных мембранных фрагментах (конфигурация inside-out метода patch-clamp). Регистрировали развитие активности одиночных натриевых токов при действии трипсина (в пипетке, 10 мкг/мл). Далее во внутриклеточный раствор в камере добавляли глобулярный (G)-актин (0.3 мг/мл), который полимеризовался при повышении ионной силы раствора (140 mM KCl, 1mM MgCl₂). Активность трипсин-активируемых каналов снижалась почти сразу после подачи G-актина (n=3). Столь быстрый эффект инактивации каналов может быть связан с тем, что актиновые филаменты были уже достаточно длинными и минимальное приращение мономеров эффективно закрывало канал. В следующей серии экспериментов при регистрации токов от всей клеточной мембраны (whole-cell) мы показали, что стабилизация F-актина фаллоидином (10 μM) не препятствовала активации натриевых каналов трипсином. Таким образом, перестройки актинового цитоскелета не участвуют в стимулирующем действии трипсина, при этом сборка актина на цитоплазматической стороне мембраны обеспечивает быструю инактивацию каналов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 23-25-00126).

УСИЛЕНИЕ ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛАНТИБИОТИКА НИЗИНА РАСТИТЕЛЬНЫМИ ФЛАВОНАМИ

Мартынюк В.А.*, Ефимова С.С., Остроумова О.С.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: martynyuk.va@mail.ru*

Низин является катионным антимикробным агентом, выделенным из *Lactococcus lactis*, который кроме высокой активности в отношении грамположительных бактерий (O'Reilly et al, 2023) применяется при лечении онкологии, т.к. способен ингибировать рост различных линий раковых клеток, изменяя целостность их мембраны, предположительно образуя поры (Joo et al, 2012). Ранее было показано, что флавоноид флоретин и алкалоид капсаицин, снижающие граничный потенциал мембраны, усиливают порообразующую активность низина в бислоях, обогащенных кардиолипином (Chernyshova et al., 2022).

В работе для поиска новых потенциальных усилителей порообразующей активности низина использовали флавоны (лютеолин, апигенин, байкалеин, скутеллареин, хризин и вогонин) и их 3-гидроксилированные аналоги (морин и фисетин). Модельные липидные бислои формировали по методу Монтала и Мюллера (Montal and Mueller, 1972). Оценку изменения граничного потенциала диолеилфосфохолиновых (ДОФХ) бислоев в присутствии флавонов проводили с использованием неактин-индуцированного трансмембранного тока. Для оценки регуляции флавонами порообразующей активности низина использовали липидные мембраны, сформированные из эквимольной смеси ДОФХ и кардиолипина.

Установлено, что байкалеин повышает граничный потенциал мембраны на 36 ± 11 мВ, а вогонин его не изменяет. Другие протестированные флавоны, хризин, скутеллареин, апигенин, морин, лютеолин и фисетин снижают граничный потенциал мембраны на 52 ± 5 , 53 ± 6 , 70 ± 11 , 81 ± 9 , 116 ± 10 и 105 ± 18 мВ соответственно. Сравнивая химические структуры флавонов и их

способность изменять граничный потенциал мембраны, было сделано заключение, что диполь-модифицирующие свойства молекул зависят от локализации ОН-групп, структуры гетероцикла и метилирования бензольных колец. Выявлено, что среди изученных флавонов самыми эффективными диполь-модифицирующими агентами являются апигенин, морин, лютеолин и фисетин. Введение 20 мкМ лютеолина, фисетина и морины вызывает увеличение низин-индуцированной проводимости мембраны примерно в 2-3 раза, а апигенина – в 11 раз. Полученные результаты позволяют думать, что апигенин является наиболее перспективной молекулой для разработки комбинированных препаратов «низин-флавоноид». Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-15-00417.

МОНИТОРИНГ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЕТОРАССЕЯНИЯ

Науменко М. Б.* , Москаленский А.Е.

*Новосибирский государственный университет, Новосибирск,
Россия*

E-mail: m.naumenko@ngsu.ru*

Изучение клеточного роста и деления важно в исследовании развития рака и разработке противораковой терапии. Несмотря на существование ряда подходов, таких как подсчет клеток с помощью гемоцитометра/автоматических счетчиков клеток, измерение электрического импеданса (xCELLigence) и т.д., остается востребованной разработка экономически доступного, неинвазивного и удобного в использовании метода отслеживания пролиферации клеток. Наше исследование посвящено разработке устройства мониторинга как адгезивных, так и суспензионных клеточных культур с использованием рассеяния лазерного света. Нами была проведена серия модификаций устройства, разработанного ранее в лаборатории (Litunen et al, 2023). Первоначальная оптическая схема включает в себя точечный лазерный модуль с длиной волны 850 нм, мощностью 3 мВт и набор

фотодиодов, расположенных в ряд по ширине культурального флакона Т25. Проходящий сквозь флакон лазерный луч рассеивается клетками и регистрируется на фотодиодах, позволяя проводить неинвазивный мониторинг суспензионных клеток. Для отслеживания формирования слоя адгезивных клеток прибор был дополнен вторым лазерным модулем, направленным вдоль дна флакона. Валидация прибора проводилась с использованием бактериальных суспензионных клеток *E. coli* и адгезивных клеток НЕК293.

Результаты экспериментов показали ожидаемые закономерности изменения интенсивности светорассеяния во времени. Таким образом, мы разработали новый оптический прибор, позволяющий контролировать пролиферацию клеток различной степени адгезивности в стандартном флаконе Т25. Прибор проводит экономически эффективные, неинвазивные, непрерывные измерения пролиферации клеток и применим в различных областях исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект FSUS-2020-0039).

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ТРАНСДУКЦИИ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ МЫШИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРЕХ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ
ВИРУСНОГО КАПСИДА**

**Ни В.И.*, Филатова Е.В., Мешалкина Д.А., Морина И.Ю.,
Фирсов М.Л.**

Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.

Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: asioflammeus203@gmail.com*

Исследование механизмов восстановления зрения при дегенерации фоторецепторов различного генеза требует подбора специфических конструкций для заражения целевых клеток. Одной из актуальных задач оптогенетического протезирования является направленная

трансдукция ON-биполярных нейронов. Это необходимо для возникновения системы передачи сигнала, схожей с таковой в здоровой сетчатке. Эта специфичность может достигаться за счет использования носителей, заражающих конкретные типы клеток, или благодаря особым последовательностям внутри самой плазмиды. В этом исследовании мы провели сравнительный анализ трёх вариантов аденоассоциированного вирусного (AAV) капсида для определения, наиболее эффективно заражающего ON-биполярные нейроны. Геном использованной для сборки трансферной плазмиды pAAV-CAG:Rhodopsin-Venus содержит промоторную последовательность CAG для убиквитарной экспрессии для исключения влияния специфичности промотора на результаты исследования.

Для исследования были взяты зрячие мыши линии C57BL. Они получали однократные интравитриальные инъекции векторами, кодирующими родопсин и флуоресцентный белок Venus. Для сборки использовались три варианта капсидов: 7M8, РНР.eВ и 7M8/РНР.eВ. После уколов мыши содержались в одиночных клетках месяц для получения максимальной экспрессии генетической конструкции, затем глаза забирались для гистологического анализа. Гистологический анализ производился на поперечных срезах 7M8 (n=11), РНР.eВ (n=12), 7M8/РНР.eВ (n=7). Оценка локализации трансдуцированных клеток в сетчатке показала, что заражение биполярных клеток наблюдается в 80% глаз при инъекции вируса 7M8 и менее чем в 50% глаз при использовании РНР.eВ и 7M8/РНР.eВ. При этом наблюдаемый уровень экспрессии маркерного флуоресцентного белка сопоставим у трех вирусов. Ни один из исследованных вирусов не обладает специфичностью к какому-либо слою сетчатки, заражая в сопоставимых пропорциях все слои. В качестве оценки повреждения сетчатки использовался анализ толщины ядерных слоев. При инъекциях 7M8/РНР.eВ наименее поврежден внутренний ядерный слой, РНР.eВ наименее токсичен для внешнего ядерного слоя, а 7M8 нарушал структуру и толщину обоих слоёв.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2022-296.

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И
АКТИВНОСТИ ЭНДОГЕННЫХ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ
ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ ANO6 ИОНАМИ КАЛЬЦИЯ В
КЛЕТКАХ НЕК293**

**Решетин Д.С.*, Колесников Д.О., Григорьева Е.Р.,
Номеровская М.А., Казначеева Е.В.**

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: dima.reshetin@mail.ru*

Белки семейства аноктаминов (ANO) формируют кальций-зависимые хлорные каналы (CaCC). Наиболее необычным представителем семейства является ANO6 (TMEM16F). ANO6 представляет собой трансмембранный белок, обладающий функциями липидной скрамблазы и ионного канала. ANO6 участвует в модуляции площади плазматической мембраны и регуляции трансмембранного потенциала. Нарушения функций ANO6 приводят к развитию множества патологий.

С помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) мы регистрировали токи через одиночные эндогенные каналы ANO6 с целью изучения влияния ионов кальция при различных внутриклеточных и наружных концентрациях на электрофизиологические свойства каналов.

Мы показали, что высокая концентрация ионов кальция во внеклеточном растворе увеличивает активность эндогенных каналов ANO6; проницаемость эндогенных каналов ANO6 по отношению к хлорид-ионам не зависит от внеклеточной концентрации ионов кальция; увеличение внутриклеточной концентрации кальция приводит к активации эндогенных каналов ANO6 с двойной амплитудой тока; кинетика работы канала зависит от потенциала плазматической мембраны, но не от внутриклеточной концентрации ионов кальция.

Выявленные нами механизмы регуляции активности каналов ANO6 демонстрируют возможные пути тонкой настройки функционирования канала в нормальных физиологических условиях и в условиях патофизиологии.

Работа была поддержана грантом РФФ № 23-44-00054.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВ С МЕМБРАНАМИ И МЕМБРАННЫМИ БЕЛКАМИ

Селютина О.Ю.^{1,2*}, Кононова П.А.¹, Поляков Н.Э.^{1,2}

¹ Институт химической кинетики и горения им. В. В.

Воеводского, Новосибирск, Россия

² Институт химии твердого тела и механохимии,

Новосибирск, Россия

E-mail: olga.gluschenko@gmail.com*

Для достижения эффекта в организме молекула лекарства обычно должна взаимодействовать с рецептором, расположенным на клеточной мембране или внутри клетки. Изменения в структурной организации мембран могут повлечь за собой изменения в активности встроенных в них белков. Понимание мембранных взаимодействий имеет огромное значение при разработке и тестировании новых лекарственных молекул или новых систем доставки лекарств.

Клеточная мембрана представляет собой сложную и разнообразную систему, состоящую из большого количества различных липидов, стерина и углеводов. Состав мембраны и ее структура играют важную роль в функционировании встроенных мембранных белков. Например, изменение кривизны мембраны может привести к открытию или закрытию механочувствительных мембранных каналов.

Несмотря на важность мембраны, влияние лекарств на ее структуру и функции часто игнорируется в исследованиях, связанных с механизмами действия лекарств. Аналогично, редко изучается, как изменения свойств мембраны, вызванные лекарствами, влияют на функции встроенных мембранных белков. Это объясняется высокой сложностью мембраны, что делает систематические исследования очень сложными. Кроме того, эксперименты с использованием целых клеток часто требуют больших затрат времени и средств и в большинстве случаев не подходят для рутинного скрининга.

Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) позволяет работать с модельными мембранами, состоящими из различных липидов, имитирующих состав биологической мембраны. Таким образом, взаимодействие лекарств с мембранами и встроенными в них белками можно производить в жестко заданных условиях, что позволяет помимо прочего определить вклад различных факторов (рН среды, липидный состав мембраны, поверхностный заряд) на взаимодействие лекарства как с самой мембраной, так и со встроенным в нее белком. Методами ЯМР нами было изучено взаимодействие ряда малых лекарственных молекул с липидными мембранами, а также фрагментами мембранно-связанных белков, в частности, трансмембранного домена (ТМД) белка оболочки коронавируса SARS-CoV-2. Была определена локализация малых молекул внутри мембраны, а также их влияние на локализацию ТМД.

**ВЛИЯНИЕ ТРИЙОДИРОНИНА *IN VITRO* НА
ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА BCL-2 В КЛЕТКАХ
ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ КУР**

**Смекалова А.А.*, Митяшова О.С., Монтвила Е.К.,
Алейникова О.В., Лебедева И.Ю.**

*Федеральный исследовательский центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Подольск, Россия*

E-mail: araksia86@mail.ru*

Гормоны щитовидной железы оказывают регуляторное влияние у позвоночных на рост, дифференцировку и функциональную активность клеток различного типа. В яичнике кур также идентифицированы элементы тиреоидной системы, необходимые для реализации влияния этих гормонов. В представленной работе изучали *in vitro* действие трийодтиронина (Т3) на экспрессию белков Вах и Bcl-2, связанных с митохондриальным путем апоптоза, в клетках преовуляторных фолликулов домашней курицы. В экспериментах использовали птиц (n=6) в возрасте 27-34 недель с высокой интенсивностью яйцекладки. Клетки гранулезы и теки,

выделенные из двух самых больших преовуляторных фолликулов F1 и F2, культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, США). После образования монослоя среду заменяли на свежую среду без сыворотки и клетки культивировали в течение 48 ч в отсутствие (контроль) или в присутствии T3 (Sigma, США) в концентрации 0.5-8.0 нг/мл. Уровень экспрессии белков в гранулезных и текальных клетках определяли иммуноцитохимическим методом с использованием мышиных моноклональных антител к Вах и Bcl-2 (Atagenix, КНР). Воздействие T3 на клетки гранулезы из фолликулов F1 приводило к повышению в 1.1 раза ($P < 0.05$) по сравнению с контролем доли клеток, экспрессирующих проапоптотический белок Вах (при концентрации 1.0-8.0 нг/мл) и антиапоптотический белок Bcl-2 (при концентрации 2.0-8.0 нг/мл). Однако T3 не влиял на эту экспрессию в клетках гранулезы из фолликулов F2. Трийодтиронин (1.0-8.0 нг/мл) также повышал в 1.1 раза ($P < 0.05$) долю Вах и Bcl-2-позитивных клеток теки из фолликулов F1. Кроме того, при культивировании текальных клеток из фолликулов F2 в присутствии T3 (2.0-8.0 нг/мл) наблюдалось увеличение в 1.1-1.2 раза ($P < 0.01$) уровня экспрессии Bcl-2 по сравнению с контролем. Таким образом, T3 в физиологической концентрации стимулировал *in vitro* экспрессию белков Вах и Bcl-2 в клетках гранулезы и теки в случае фолликулов F1. В то же время T3 усиливал только экспрессию Bcl-2 и тем самым сдвигал баланс в сторону этого антиапоптотического фактора в клетках теки в случае фолликулов F2. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-16-00149).

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ *IN VITRO*

Фурман В.В.^{1,2*}, Семенова С.Б.²

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail*: furmanvivi@gmail.com

Эпителий кишечника выполняет барьерную функцию, препятствуя попаданию содержимого из просвета кишечника в кровь и пропуская только необходимые вещества. При нарушении проницаемости кишечного эпителия через стенку кишечника могут проникать различные микроорганизмы, токсины и антигены, что может привести к развитию воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

Для выявления факторов, которые могут влиять на проницаемость кишечного эпителия, использовали клеточную *in vitro* модель кишечного эпителия на основе клеточной линии колоректальной аденокарциномы Caco-2. Качество формирования эпителия оценивали путём измерения сопротивления, иммунофлуоресценции и определения коэффициента проницаемости (P_{app}) слоя.

Было показано, что культивирование в течение 2–3 недель клеток Caco-2 на полупроницаемых мембранах приводит к формированию поляризованного клеточного монослоя. Иммунофлуоресцентное окрашивание выявило формирование плотного слоя клеток, имеющих апикальную, содержащую микроворсинки, и базолатеральную поверхности.

Измеренное с помощью эпителиального вольтметра сопротивление росло от 40 Ом·см² до 450 Ом·см² в течение 2–3 недель и выходило в насыщение.

Коэффициенты проницаемости слоя для FITC-декстрана (FID) были рассчитаны по формуле, производной от первого закона Фика, адаптированной для измерения проницаемости клеточного слоя.

Коэффициенты проницаемости кишечного эпителия для FID были получены для контрольных клеток и клеток, инкубированных с реагентами, влияющими на цитоскелет, динамин-зависимый

эндоцитоз, на ионные каналы и Na^+/K^+ -АТФазу. Показано, что при ингибировании полимеризации актина P_{app} увеличился примерно в пять раз по сравнению с контрольными клетками. При ингибировании кальциевого канала TRPV6 P_{app} увеличился в два раза, в то время как ингибирование риаудиновых рецепторов и депо-зависимых кальциевых каналов не повлияло на проницаемость эпителиального слоя для FID.

В результате проведенной работы была получена клеточная модель кишечного эпителия, позволяющая проводить фундаментальные исследования процессов, связанных с проницаемостью кишечника для биологически важных веществ, а также тестировать действие различных реагентов, в том числе и лекарственных препаратов на проницаемость кишечного эпителия *in vitro*.

МЕХАНИЗМ ФУЗОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ФРАГМЕНТОВ ПЕПТИДОВ СЛИЯНИЯ ВИРУСОВ МАРБУРГ И ЭБОЛА

Шекунов Е.В.* , Ефимова С.С., Остроумова О.С.

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: egor_shekunov@mail.ru*

Вирусы Эбола и Марбург являются оболочечными вирусами семейства *Filoviridae*. Филовирусы обладают высокой летальностью, при этом вакцин или одобренных методов лечения инфекций, вызванных данными вирусами, не существует. Изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе объединения липидных мембран вириона и клетки, является важной задачей, поскольку позволяет выявить возможные подходы к его ингибированию.

Используя метод флуориметрии и модельную систему, в основе которой лежит слияние липосом заданного состава, мы установили, что добавление 100 μM пептидов слияния вирусов Марбург (псМ) и Эбола (псЭ) к везикулам из фосфатидилхолина (ФХ)/сфингомиелина (СМ)/холестерина (ХОЛ) (60/20/20 мол.%) вызывает слияние 84% и 53% липосом соответственно. Замена ФХ на фосфатидилсерин (ФС) (ФС/СМ/ХОЛ (60/20/20 мол.%)

приводит к двукратному падению активности псМ (40%) и псЭ (22%). Включение фосфатидилэтаноламина (ФЭ) в состав липидной композиции (ФХ/ФЭ/СМ/ХОЛ (30/30/20/20 мол.%) приводит к значительному снижению фузогенного действия псМ (17%) и псЭ (3%).

Поскольку эластические свойства мембраны играют важную роль в процессах слияния мембран мы изучили фазовое поведение липидов в присутствии псМ и псЭ методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. Установлено, что добавление псЭ (молярное соотношение липид:пептид 25:1) практически не влияет на основной фазовый переход (T_m) ФХ. В свою очередь, включение псМ увеличивает ширину пика (ΔT_b) (0.4 °C) и снижает энтальпию перехода (ΔH). Замена ФХ на ФЭ ослабляет способность псМ модифицировать термотропные характеристики липидов, а активность псЭ остается примерно на том же уровне. Исследования с использованием ФС, демонстрируют, что добавление псМ и псЭ приводит к повышению T_m (0.3 и 0.1 °C соответственно).

Суммируя полученные результаты, можно предположить, что основным механизмом фузогенной активности пептидов слияния вирусов Марбург и Эбола является их способность дегидратировать поверхность мембраны. Это уменьшает степень гидратного отталкивания, которое возникает в результате приближения сливающихся мембран друг к другу, что в конечном итоге облегчает слияние.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда № 22-15-00417.

Секция «Генетические и омиксные технологии
в биологии и медицине»

**ПРЕДИКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ
МОРФОКИНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
ДОИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА**

Архипова Т.С.^{1*}, Татищева Ю.А.², Сайфитдинова А.Ф.¹

¹ *Российской государственной педагогической университет им.*

А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

² *Клиника репродукции «Скайферт», Санкт-Петербург,
Россия*

E-mail: archipova_tanya@mail.ru*

Введение. В практику вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) внедряются системы покадровой съемки и дальнейшей визуализации — time-lapse инкубаторы (TL), позволяющие на основе дополнительных программных обеспечений (ПО) оценивать каждый эмбрион. Использование преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) позволяет повысить эффективность ВРТ за счет выбора эуплоидных эмбрионов, однако это требует проведения инвазивной процедуры (биопсии трофобласта). Для сокращения внешнего вмешательства необходимо оценить возможности TL для выбора наиболее жизнеспособных эмбрионов на основе морфокинетических характеристик.

Цель исследования. Определение предиктивного значения морфокинетической оценки развития эмбрионов с использованием ПО TL инкубатора для выбора эуплоидных эмбрионов.

Материал и методы. Использованы данные клиники репродукции «Скайферт» из циклов ВРТ с использованием TL и последующим ПГТ-А методом NGS. Для статистического анализа применялись U-критерий Манна-Уитни, программы StatPlus и Microsoft Excel. Все эмбрионы были разделены на группы в зависимости от дня окончания культивирования (5 и 6 день) и возраста генетической матери (до 36 лет и от 37 лет и старше), и на подгруппы в зависимости от полученной оценки ПО (№1 с диапазоном оценок 0—3,99; №2 4—5,99; №3 6—7,99; №4 8—10).

Результаты. Выявлено, что среди эмбрионов, культивируемых как до 5 (d5), так и до 6 (d6) дня развития из ооцитов женщин до 36 лет преобладают эуплоидные эмбрионы (d5 $p=0,0014$, d6 $p=0,00005$), а из ооцитов женщин от 37 лет и старше всегда преобладают анеуплоидные эмбрионы (d5 $p=0,00005$, d6 $p=0,000026$). По данным, полученным после культивирования в TL инкубаторе и последующим ПГТ-А методом NGS, установлены границы возраста для женщин (24-36 лет), когда может быть обоснованно применение TL для выбора эуплоидных эмбрионов (d5 $p=0,026$, d6 $p=0$).

Выводы. В результате исследования был показан высокий потенциал внедряемой TL микроскопии для оценки качества эмбрионов с использованием ПО TL инкубатора для эмбрионов женщин 24-36 лет. Для женщин от 37 лет и старше применение только TL не способно снизить риск выбора анеуплоидного эмбриона без дополнительного проведения ПГТ-А.

SCRNA-SEQ REVEALS DISTINCT CHARACTERISTICS OF DIFFERENT PITNET TYPES

Asaad W.^{1*}, Deviatiiarov R.^{1,2}, Utkina M.¹

¹ *Department of General, Molecular and Population genetics, Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia*

² *Graduate School of Medicine, Juntendo University, Tokyo, Japan*

E-mail: walaaakasaad94@gmail.com*

Pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs) are benign tumors originating from the anterior lobe of the pituitary gland. In our study, we included 10 PitNET samples (3 functioning somatotroph adenomas (FSA), 3 functioning corticotroph adenomas (FCA), 2 silent gonadotroph adenomas (SGA), and 2 silent somatotroph adenomas (SSA)) described using scRNA-seq. We aimed to investigate the characteristics of tumor cells and microenvironment by studying tumor cell proliferation/death, immune cell polarization, tumor invasion, and endothelial-mesenchymal transition (EMT) gene markers. Based on known tissue-specific marker genes, we identified six main cell clusters in all PitNET samples. The analysis revealed a higher potential for M1 macrophage polarization in

FSA compared to SSA, indicated by higher expression levels of *CD86* and *CCL5* genes. Interestingly, we found a higher expression of the *ARG1* gene in FSA and FCA than in SSA and SGA. The low expression of *ARG1* in SSA indicates fewer M2 macrophage proliferation in these tumors. This was supported by our findings of less stimulation of EMT in the studied silent PitNETs compared to the functioning ones, considering the role of M2 macrophage polarization in the EMT process. In addition, we found *NPY* gene expression in both studied functional types of PitNETs, rather than in the two silent forms, which might indicate a role of *NPY* in ACTH hormone release from FCA similar to the previously described role of *NPY* in releasing growth hormone from patients with prolactinomas. Analysis of cell death markers showed an elevated expression level of *PDCDI* in FSA compared with other tumor samples. In fact, this gene has been demonstrated to play a role in anti-tumor immunity. Studying the EMT and cell-cell adhesion markers showed significant differences between functioning and silent adenomas, such as the high expression of *SNAI* in FCA and FSA as well as a significantly higher expression of *ASCL1* in FCA. *ZEB2* also found to be significantly higher in SSA.

Funding: The study is supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 075-15-2022-310 from 20 April 2022)

**СОЗДАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ
ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДЕФИЦИТА
ПИРУВАТКИНАЗЫ *FELIS CATUS***

**Болотникова Т.А.^{1*}, Владимиров И.А.², Богомаз Д.И.^{1,2},
Павлова О.А.², Воробьев К.В.¹**

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

² ООО "Бигль", Санкт-Петербург, Россия

E-mail*: bolotnikova@ro.ru

Дефицит эритроцитарной пируваткиназы – породоспецифичное аутосомно-рецессивное заболевание домашних кошек (*Felis catus*).

Снижение активности пируваткиназы вызвано однонуклеотидной заменой (SNP) в гене *PKLR* (с.693+304G>A): преждевременный стоп-кодон образуется в 248 положении 6 экзона (Grahn et al., 2012). Цель исследования заключалась в создании тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени с дифференцирующими TaqMan зондами и ее отработке на гетерозиготном и гомозиготных материалах. Амплификацию целевого фрагмента (105 bp) проводили методом ПЦР со специфическими праймерами (Kushida et al., 2015) к области интрона 5 гена *PKLR* на матрице ДНК здорового животного (буккальный эпителий). Получили плазмиду pJET1.2_PKLRWt со вставкой, имитирующей ДНК-матрицу с аллелью дикого типа. В результате направленного мутагенеза получили плазмиду pJET1.2_PKLRMut со вставкой, имитирующей ДНК-матрицу с мутантной аллелью.

Для оптимизации диагностической системы дифференцирующие зонды были укорочены (*PKLR_WtSh1* и *PKLR_MutSh1*). Система показала высокую специфичность и корректность работы при оптимизированной температуре отжига ($t=55^{\circ}\text{C}$). Полученная диагностическая система эффективно дифференцирует аллели дикого типа, мутантные аллели и гетерозиготные состояния гена *PKLR*; может быть рекомендована для испытаний в ветеринарной практике.

**ИСЧЕЗНОВЕНИЕ ТОПОЛОГИЧЕСКИ
АССОЦИИРОВАННЫХ ДОМЕНОВ ХРОМАТИНА ПРИ
ЭРИТРОИДНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ: РЕЗУЛЬТАТЫ
FISH-ВИЗУАЛИЗАЦИИ**

Валевская Д.Л., Маслова А.В., Красикова А.В.*

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: alla.krasikova@gmail.com*

Эритропоэз у курицы сопровождается компактизацией ядра и конденсацией хроматина. При этом наблюдаются значительные изменения организации генома, консервативные для всех

позвоночных. Hi-C карты хроматина, полученные для эритробластов курицы линии HD3, свидетельствуют о существовании А и В компартментов, а также топологически ассоциированных доменов (ТАДов) в этом типе клеток. Как и в других соматических клетках, в эритроцитах курицы хроматин разделен на компартменты. Важной особенностью генома зрелых эритроцитов является отсутствие ТАДов. На картах Hi-C, полученных для эритроцитов курицы, появляется вторая диагональ, которая свидетельствует о повышении частоты контактов хроматина на дальних расстояниях, что может свидетельствовать о формировании длинных петель хроматина. Однако метод Hi-C не отражает особенности архитектуры хроматина в каждой отдельной клетке, поэтому целесообразно применять и метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), который позволяет визуализировать геномные локусы и измерить 3D расстояния между ними.

В настоящей работе мы использовали метод 3D-FISH, чтобы сравнить трехмерную организацию нанодоменов хроматина в эритроблестах и зрелых эритроцитах курицы. Нам удалось подтвердить существование ТАДов в эритроблестах курицы линии HD3. Так, в клетках HD3 в трех районах хромосом трехмерные расстояния между линейно равноудаленными геномными локусами, находящимися внутри ТАДа, значимо меньше, а процент их колокализации больше, чем между сигналами из двух соседних ТАДов. В зрелых эритроцитах курицы геномные локусы внутри ТАДов, идентифицированных в клетках линии HD3, демонстрируют низкий уровень колокализации, что подтверждает исчезновение ТАДов в ходе эритропоэза. Исключение составляет один район, в котором расстояния и процент колокализации между локусами достоверно различаются, что свидетельствует о существовании единичного ТАД-подобного домена в этом районе. Кроме того, в зрелых эритроцитах трехмерные расстояния между локусами в среднем больше, чем соответствующие расстояния в клетках линии HD3, что может свидетельствовать о формировании крупных петель хроматина. Таким образом, результаты FISH-визуализации на цитологическом уровне свидетельствуют о значительных

перестройках трехмерной архитектуры генома клеток эритроидного ряда в ходе их дифференцировки.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 19-74-20075 с использованием оборудования ресурсного центра "Развитие молекулярных и клеточных технологий" Научного парка СПбГУ.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМИДЫ ИЗ ШТАММА *STUTZERIMONAS STUTZERI* DIA-8 БИОИНФОРМАТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Гусманова Ю.Р.^{1*}, Бабынин Э.В.^{1,2}

¹ *Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Казань, Россия*

² *Федеральный исследовательский центр Казанского научного
центра РАН, Казань, Россия*

E-mail: YRGusmanova@stud.kpfu.ru*

Плазмиды представляют собой внехромосомные независимо реплицирующиеся молекулы ДНК. Они способствуют распространению устойчивости к антибиотикам, а также участвуют в передаче катаболических функций внутри почвенных бактериальных сообществ, способствуя адаптации бактерий к условиям окружающей среды.

Ранее нами был секвенирован геном штамма *Stutzerimonas stutzeri* DIA-8, выделенного из нефтезагрязненной почвы на территории Ромашкинского месторождения Республики Татарстан, который показал способность расти на среде, где единственным источником углерода была нефть. В этой работе мы биоинформатическими методами показали присутствие у штамма DIA-8 плазмидной ДНК. Наличие плазмиды в геноме *S. stutzeri* DIA-8 было выявлено с помощью plasmidSPAdes (Galaxy Version 3.15.5+galaxy2). Прогноз резистома, выполненный с применением CARD, не обнаружил на плазмиде генов антибиотикорезистентности.

Для поиска гомологичных референсных последовательностей плазмид использовали BLASTN. Было установлено, что

последовательность плазмиды из штамма DIA-8 имела гомологию с плазмидой pPSEST01, обнаруженной у штамма *S. stutzeri* RCH2, выделенного из загрязненных хромом почв на объекте Министерства энергетики в Хэнфорде (США). Для сравнительного геномного анализа плазмид использовали OrthoVenn3. Анализ показал, что плазида из *S. stutzeri* DIA-8 и плазида pPSEST01 совпадают по 15 ортологичным кодирующим белок последовательностям и содержат специфические неперекрывающиеся гены в количестве 4 на плазмиде pPSEST01 и 7 на плазмиде из *S. stutzeri* DIA-8. Среди таких генов на плазмиде из штамма DIA-8 можно отметить транспозазу семейства ISWpi3 мобильных элементов IS110, неохарактеризованную сайт-специфическую тирозин-рекомбиназу, белок репликации бактериальной плазмиды (Rep), который обеспечивает инициацию репликации по типу катящегося кольца, а также регулятор накопления углерода CsrA. CsrA является глобальным посттранскрипционным регулятором и контролирует многие физиологические процессы и характеристики, включая центральный углеродный метаболизм, реакцию на стресс, биогенез системы секреции, подвижность клеток, образование биопленок, чувство кворума и продукцию внеклеточных соединений.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ CRISPR/CAS9 ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ РВР4 В ФОРМИРОВАНИИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Кандина Д.А.^{1*}, Сопова Ю.В.^{1,2}, Велижанина М.Е.¹

¹ *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

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

E-mail: candyda20@mail.ru*

Проблема антибиотикорезистентности активно развивается в последнее десятилетие. Грамположительная бактерия *Staphylococcus aureus* является распространенным возбудителем

генерализованных инфекций человека с высокой заболеваемостью и смертностью.

Пенициллинсвязывающий белок 4 (PBP4) является критическим фактором, определяющим устойчивость *S. aureus* к бета-лактамым антибиотикам. PBP4 способен осуществлять транспептидазную активность в отношении частично сшитого пептидогликана, тем самым восстанавливая дефекты пептидогликана в клетках (Basuino L., et al, 2018).

S. aureus трудно поддается генетическому манипулированию, но одним из успешно работающих вариантов для редактирования является двухкомпонентная система, основанная на гомологичной рекомбинации, совмещенной с Cas9-опосредованной контрелекцией (Penewit K., et al, 2018).

После двух последовательных трансформаций модельного штамма *S. aureus* RN4220 плазмидами pCN-EF2132tet с геном рекомбиназы EF2132 *E. faecalis* и pCAS9counter с геном нуклеазы Cas9 *S. pyogenes* совместно с sgRNA был получен штамм с целевой делецией в гене *pbp4*. Делеция, затрагивающая 107 нуклеотидов, приводит к сдвигу рамки считывания, поэтому синтез белка в этом случае останавливается после первых 17 а.к. Образующийся пептид нефункционален, поэтому данная делеция приводит к полной инактивации гена *pbp4*.

Была проведена фенотипическая проверка штамма *S. aureus* с мутацией по таким характеристикам, как культурально-морфологические параметры: чувствительность к антибиотикам различных классов, действующих на клеточную стенку, и оценка скорости роста. Добавление в среду бета-лактамы антибиотиков и ванкомицина приводит к снижению скорости роста, при этом снижение более очевидно на среде с ампициллином.

Работа выполнена при финансовой поддержке СПбГУ PURE ID 95444727.

**ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ SRY-Δ
И BEAF-32 В ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ *ALH*, *RPS2* И *TDRD 3*
НА ИХ ЭКСПРЕССИЮ**

Козельчук Н.Я.* , Четверина Д.А., Ерохин М.М.

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

E-mail: nyk95@yandex.ru*

Многие топологически-ассоциированные домены (TAD) дрозофилы разделены участками активного хроматина, обогащенными инсуляторным белком BEAF-32 (Boundary Element-Associated Factor) (Ramírez et al., 2018), который также является промоторным фактором (Dong et al., 2020).

Так как деплеция BEAF-32, по данным Hi-C, не приводит к глобальному изменению структуры TADов (Cavalheiro et al., 2023), мы предположили, что роль в поддержании структуры границ TADов могут играть ассоциированные с BEAF-32 факторы. Одним из таких является транскрипционный фактор Serendipity δ (Sry- δ) (Dong et al., 2020).

На основании имеющихся данных мы выбрали три промотора, которые связывают BEAF-32 и Sry- δ по данным ChIP-seq, и которые имеют мотивы связывания этих белков. Это промоторы генов *Alh* (Alhambra), *Rps2* (Ribosomal protein S2), *Tdrd 3* (Tudor domain-containing protein 3).

Нашей задачей было промутировать сайты связывания BEAF-32 и Sry- δ в этих промоторах и оценить, как это скажется на экспрессии гена.

Для этого нами были получены трансгенные линии мух *Drosophila melanogaster*, экспрессирующие люциферазу Firefly (Fluc) под контролем одного из трёх выбранных промоторов. Далее эта линия была скрещена с линией, несущей конструкцию с люциферазой Renilla (Rluc) под контролем активного промотора *Act5c*. Эта люцифераза использовалась для нормировки сигнала. В промоторы *Alh*, *Tdrd* и *Rps2* вносились мутации сайта связывания BEAF-32 или Sry- δ , контролем служили линии с немутантными сайтами. Измерение люциферазной активности проводилось на личинках.

В результате было показано, что внесение мутаций в сайты связывания BEAF-32 и Sry-d во всех трех промоторах приводит к снижению экспрессии репортерного гена. Особенно сильно этот эффект был замечен в случае мутации сайта Sry-δ. Здесь экспрессия люциферазы под контролем мутантных промоторов *Alh* и *Tdrd3* падала почти до нуля.

При мутации сайта BEAF-32 подобный эффект был отмечен только в промоторе *Rps2*, тогда как экспрессия с мутантных промоторов *Alh* и *Tdrd3* падала слабо.

Таким образом, была создана модельная система для исследования влияния сайтов BEAF-32 и Sry-d на транскрипцию гена.

Работа поддержана грантом РФФ №20-74-10099.

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА АКТИВАЦИИ ГЕНА XRP1
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ ДАЛЬНИМ P53-
ЗАВИСИМЫМ ЭНХАНСЕРОМ 75C6 В ЭМБРИОНАХ
DROSOPHILA MELANOGASTER**

**Конопатов А.В.^{1*}, Попова М.К.¹, Конова К.Ю.¹, Лебедева Л.А.¹,
Шидловский Ю.В.^{1,2}**

¹ *Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

² *Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, Россия*

E-mail: Konopatov777@gmail.com*

Ген *Xrp1* кодирует хроматин-связывающий белок, участвующий в поддержании стабильности генома дрозофилы, препятствующий возникновению опухолей (Mallik et. al. 2018). В норме убиквитарная экспрессия *Xrp1* начинается на поздних стадиях развития эмбриона. Однако под действием ионизирующего излучения экспрессия *Xrp1* индуцируется и на ранних стадиях в ходе взаимодействия фактора транскрипции белка p53 с энхансером p53RE, расположенным в локусе 75C6, на расстоянии более чем 20 Мпн от гена *Xrp1* (Akdemir et al., 2007). Был показан физический контакт гена *Xrp1* и энхансера p53RE, однако молекулярный механизм такого примера супер-

дальнего взаимодействия неизвестен (Link et al., 2013). Предположительно этот механизм опосредован специфическими архитектурными элементами, которые формируют хромосомную структуру высокого порядка.

Цель нашего исследования – выявить последовательности ДНК и белковые факторы, участвующие в механизме формирования указанного дальнего взаимодействия. Мы использовали два подхода: первый – мутагенез области p53RE – фрагмент, содержащий 75С6 энхансер и сайты связывания архитектурных факторов, был удален и заменен мутантными формами, в которых проведен *rescue* энхансера, но удалены отдельные сайты связывания. Затем визуализация и оценка степени сближения энхансера с геном *Xrp1* в эмбрионах под действием ионизирующего излучения методом FISH. Второй подход – создание молекулярно-генетических репортерных конструкций, каждая из которых содержит одну из частей гена *Xrp1*, предположительно ответственных за формирование контакта с p53RE, интеграция конструкций в различные локусы на правом плече третьей хромосомы и оценка уровня дифференциальной экспрессии гена-репортера в эмбрионах в ответ на облучение ионизирующим излучением.

Наибольшие уровни экспрессии гена-репортера выявлены в случае рекомбинантных линии с участками гена *Xrp1*, которые содержат сайты связывания GAF и CTCF. Подобная картина наблюдается и в экспериментах по мутагенезу области p53RE – значимое сближение происходит только в случае линий, содержащих оба этих сайта связывания в целостном виде.

Таким образом, мы предлагаем новую модель дальних взаимодействий, для работы которой необходимы два архитектурных фактора, CTCF и GAF.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 20-14-00201

**ИММОРТАЛИЗАЦИЯ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПОСРЕДСТВОМ
СВЕРХЭКСПРЕССИИ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ
СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ**

**Конюшатова А.О.* , Торопов А.Л., Дерябин П.И., Бородкина
А.В.**

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: konyushatova.alina@yandex.ru*

Эндометрий человека является внутренней слизистой оболочкой матки, которая служит местом для имплантации эмбрионов. Эндометриальные стромальные клетки (эСК) играют ключевую роль в эффективной инвазии, росте и питании зародыша. Изучение основных свойств эСК является критически важным для полноценного понимания механизмов имплантации эмбриона, однако оно ограничивается репликативным старением первичных культур этих клеток. Мы установили, что уже на 30 пассаже эСК характеризуются признаками сенесцентных клеток: увеличенным размером, повышенной активностью ассоциированной со старением β -галактозидазы, повышением уровня автофлуоресценции, потерей пролиферативной активности, гипофосфорилированием pRB, активацией генов *CDKN2A*, *CDKN1A* и других генов и белков участвующих в регуляции клеточного цикла. Ключевым подходом к преодолению репликативного старения является иммортализация. Наиболее безопасным и эффективным считается подход, предполагающий сверхэкспрессию гена каталитической субъединицы теломеразы (*TERT*). Использование такого подхода позволяет существенно увеличить репликативный потенциал клеток. Для создания иммортализованной линии эСК мы разработали дизайн лентивирусного вектора для бицистронной экспрессии *TERT* человека (*hTERT*) и синего флуоресцентного белка GFP, затем методами молекулярного клонирования осуществили сборку вектора, трансформацию бактерий, трансфекцию пакующих НЕК 293Т с целью наработки лентивирусных частиц и лентивирусную трансдукцию эСК. Полученная генетически-

модифицированная линия характеризовалась увеличенной более чем в 4 раза по сравнению с первичной линией экспрессией *hTERT*. Наличие репортерного флуоресцентного белка под одним промотором с геном *hTERT* в разработанном векторе позволило визуализировать экспрессию *hTERT*.

Полученная линия в дальнейшем будет использована в фундаментальных исследованиях в области репродуктивной биологии.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГЕНОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ МЕТОДОМ ЩЕЛОЧНОГО КОМЕТНОГО АНАЛИЗА И МИКРОЯДЕРНЫМ ТЕСТОМ

М.Н.Курчатова*¹, Н.А. Дурнова^{1,2}

*¹ Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Министерства
Здравоохранения Российской Федерации, Саратов, Россия*

*² Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Москва, Россия*

E-mail: kurchatova.marya@yandex.ru*

На сегодняшний день существуют различные методы определения как генотоксического, так и генопротекторного действия биологически активных веществ: тест Эймса, учет микроядер в клетках, анализ «ДНК-комет» и др. Согласно литературным данным, сложнокомпонентные растительные извлечения нередко демонстрируют противоположное биологически активное действие при использовании разных методов. Нами был проведен анализ биологически активной композиции из цветков бессмертника песчаного с привлечением микроядерного теста и щелочного кометного анализа.

Метод ДНК-комет основан на регистрации подвижности в электрическом поле фрагментов ДНК в агарозном геле. При электрофорезе ДНК в виде отдельных фрагментов мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост

кометы. Увеличение количества «комет» указывает на то, что исследуемое соединение индуцирует ДНК-повреждения. В нашем исследовании экстракт из бессмертника вводили в дозе 100 мг/кг перорально мышам в течение 5 суток. В группе позитивного контроля для индукции повреждений ДНК вводили модельный генотоксикант диоксидин в дозе 200 мг/кг, внутривентриально. Животным групп негативного контроля вводили эквивалентные объемы воды для инъекций. Экспериментальной группе мышей вводили экстракт в дозе 100 мг/кг перорально и диоксидин в дозе 200 мг/кг внутривентриально. Аналогичную схему эксперимента использовали для микроядерного теста, основанного на анализе фрагментов ДНК, образовавших округлые мелкие образования (микроядра) в цитоплазме клеток. Высокий уровень микроядер свидетельствует о генотоксичности исследуемого вещества.

По итогам щелочного кометного анализа введение экстракта бессмертника и диоксицина привело к достоверному снижению повреждений ДНК в клетках костного мозга до значения 11,04% Tail DNA по сравнению с группой позитивного контроля (18,05% Tail DNA).

По результатам микроядерного теста, на пятые сутки эксперимента совместное введение экстракта в дозе 100 мг/кг и диоксицина уменьшало число клеток с микроядрами в эритроцитах периферической крови ($1,558 \pm 0,252\%$) по сравнению с позитивным контролем ($2,173 \pm 0,124\%$). Таким образом, оба метода продемонстрировали одинаковое генопротекторное действие экстракта бессмертника.

**ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ
УБИКВИТИНИЛИРОВАНИЯ КОМПЛЕКСА AGO С
НЕКАНОНИЧЕСКИМИ МИШЕНЯМИ МИКРОРНК В
КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *DROSOPHILA***

**Кутелев И.А.^{1,2*}, Марфина С.В.^{1,3}, Михалёва Е.А.¹, Акуленко
Н.В.¹, Рязанский С.С.¹**

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия*

² *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

³ *Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия*

E-mail: deogratiusx@gmail.com*

МикроРНК – консервативные короткие регуляторные РНК длиной 21-23 нт, которые регулируют разнообразные молекулярные процессы, такие как дифференцировка клеток и канцерогенез. Комплекс микроРНК с белками Аргонавт (Ago) связывается с комплементарными РНК-мишенями, ускоряя их деградацию или подавляя трансляцию. Недавно показано, что при образовании особого неканонического дуплекса с РНК-мишенью происходит деградация самой микроРНК, а не мРНК. Данный механизм мишень-опосредованной деградации микроРНК (TDMD) значительно снижает уровни отдельных микроРНК в клетке и, по-видимому, характерен для всех многоклеточных животных. Известны примеры участия TDMD в регуляции органогенеза и онтогенеза, однако его молекулярный механизм остается во многом неизученным.

Возможная модель TDMD была предложена в работах на культурах клеток человека (Shi et al., 2020; Han et al., 2020). Ключевая роль в данном процессе отводится убиквитинилированию и протеолизу Ago при участии комплекса CRL и рецепторного белка ZSWIM8 в его составе. Ранее мы иммунопреципитировали ортолог ZSWIM8 (Dora) из культуры клеток *Drosophila* OSC с последующим масс-спектрометрическим анализом. Результаты указывают на сходное строение CRL дрозофилы и человека. Так, помимо Dora, в состав

комплекса входит каркасный белок Cul3, адаптерные EloB и EloC, а также белок UbcE2M, участвующий в переносе убиквитин-подобного белка NEDD8 на Cul3. Считается, что недиллирование необходимо для активности CRL. Нокаут гомологов этих генов у человека приводит к ингибированию TDMD и дерепрессии ряда микроРНК.

Для проверки участия обнаруженных компонентов CRL в TDMD у дрозофилы, мы провели нокаун их генов. Мы показали, что только нокаун *Cul3*, но не *UbcE2M*, *EloB* или *EloC*, приводит к значимой дерепрессии маркерных микроРНК. Таким образом, несмотря на присутствие в составе CRL дрозофилы тех же белков, что и у человека, их наличие не является строго обязательным для TDMD. Это указывает на различия в работе CRL у человека и дрозофилы, расширяя наши знания о молекулярных механизмах TDMD у животных.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ "Курчатовский институт".

ПРЕДСКАЗАНИЕ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ МИКРОРНК ТРЕМАТОД В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ВЕРИФИКАЦИЯ НА ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ ХОЛАНГИОЦИТОВ

**Лишай Е.А.^{1,2*}, Пономарев Д.В.², Медведева Е.В.^{1,2},
Запарина О.², Пахарукова М.Ю.²**

¹ *Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия*

² *Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия*

E-mail: lishai.ekaterina@gmail.com*

Opisthorchis felineus – это трематода семейства Opisthorchiidae, паразитирующая в желчных протоках млекопитающих, включая человека. Длительное инфицирование приводит к неоплазии эпителия желчных протоков.

Внеклеточные везикулы, секретлируемые трематодами, поглощаются клетками хозяина и содержат биологически активные соединения, в

том числе микроРНК, которые относятся к малым некодирующим РНК и, возможно, участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов хозяина. Целью работы является поиск механизмов воздействия *O. felineus*, опосредуемых через микроРНК внеклеточных везикул трематоды, на холангиоциты человека.

Малые РНК были выделены из внеклеточных везикул *O. felineus*, кДНК-библиотеки секвенировали на платформе DNBSEQ 1X50 п.н. (BGI, Китай). Для идентификации микроРНК *O. felineus* использовали алгоритм miRDeep2. Для поиска генов-мишеней микроРНК в геноме человека применяли TargetScan и miRDB. В качестве клеточной модели использовали линию холангиоцитов (клеток эпителия желчных протоков) человека H69. Холангиоциты обрабатывали внеклеточными везикулами, затем выделяли мРНК, получали кДНК-библиотеки и секвенировали на платформе DNBSEQ 2X150 п.н. (BGI, Китай). Полученные последовательности картировали с помощью алгоритма STAR. Для анализа дифференциальной экспрессии генов использовали R-пакет DESeq2. Показана интернализация везикул холангиоцитами человека с помощью флюоресцентной микроскопии. Представленность различных микроРНК отличалась во внеклеточных везикулах и в лизате взрослых червей. Это может объясняться тем, что некоторые микроРНК трематод синтезируются преимущественно в составе внеклеточных везикул и могут воздействовать на клетки хозяина. Среди мажорных микроРНК трематод были найдены гомологи человеческих микроРНК. Вероятно, они имеют одни и те же гены-мишени в клетках человека. По данным транскриптома холангиоцитов наблюдали обогащение по генам-мишеням микроРНК среди дифференциально экспрессирующихся генов. Работа выполнена при финансовой поддержке РФ (проект №24-44-00048).

**IN VITRO ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ НУКЛЕАЗЫ CATCAS12A –
НОВОГО ОРТОЛОГА ЭФФЕКТОРНЫХ БЕЛКОВ CRISPR-
CAS СИСТЕМ V-A ТИПА**

**Малышева П.В.^{1*}, Васильева А.А.², Арсениев А.Н.², Абрамова
М.В.² Ходорковский М.А.²**

¹ *Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский Политехнический Университет
Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
E-mail*: pp.malysheva@gmail.com*

Введение. CRISPR-Cas системы, состоящие из CRISPR-кассеты и Cas-белков, являются системами адаптивного иммунитета прокариот. Работа таких систем основана на том, что комплекс из Cas-белка и направляющей crRNA вносит направленные разрывы в ДНК после образования дуплекса crRNA-ДНК и распознавания мотива, примыкающего к мишени (PAM). Возможность внесения таких разрывов в ДНК делает Cas-нуклеазы эффективными инструментами для технологий геномного редактирования и разработки диагностических тест-систем (Paul, 2020), а задача поиска новых Cas-нуклеаз становится актуальной.

Основная часть. В данной работе мы биоинформатически предсказали CRISPR-Cas систему V-A типа с эффекторной нуклеазой Cas12a в геноме *Catenovulum* CCB-QB4 – аэробной бактерии с поверхности морской водоросли.

После сбора данных об экспериментально охарактеризованных белках Cas12a на их основе был составлен профиль HMM. Затем проводился поиск CRISPR-кассет в геномах бактерий из базы данных GenBank в программе CRT (Bland, 2007). В локусе с найденными кассетами произведен поиск всех открытых рамок считывания (ORF), их сравнение с профилем HMM. Отобранные ORFs проверены на уникальность. Для дальнейшей работы была выбрана CRISPR-Cas система из генома *Catenovulum* с эффекторным белком CatCas12a.

Для получения рекомбинантной формы белка клетки-продуценты *E. coli* Rosetta (DE3) были трансформированы плазмидой с геном *catcas12a*, произведена наработка биомассы, из которой проводилось выделение целевого белка методами аффинной хроматографии и гель-фильтрации.

Далее выполнена проверка наличия нуклеазной активности *in vitro* на ДНК-фрагментах, содержащих 5, 7 или 10 рандомизированных нуклеотидов в позициях PAM. По результатам тестов CatCas12a демонстрирует направленную нуклеазную активность на выбранных мишенях. В дальнейшем планируются эксперименты по подбору оптимальных условий для работы белка, а также определение PAM.

Выводы. В данной работе был проведен биоинформатический поиск CRISPR-Cas систем в геномах бактерий и характеристика эффекторного белка CatCas12a бактерии *Catenovulum* ССВ-QB4, который имеет *in vitro* нуклеазную активность.

УЧАСТИЕ БЕЛКА NUP93 В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ЭКДИЗОН-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ *DROSOPHILA* *MELANOGASTER*

Мандыбура В.А., Евдокимова А.А., Воробьева Н.Е.*

Институт Биологии Гена РАН, Москва, Россия

E-mail: vorobyeva@genebiology.ru*

Достаточно давно для *Drosophila melanogaster* было обнаружено, что белки-компоненты ядерной поры не только опосредуют ядерный молекулярный транспорт, но и активным образом участвуют в регуляции транскрипции генов. В частности, было показано, что отдельные компоненты ядерной поры взаимодействуют с регуляторными участками ДНК (промоторами и энхансерами) генов, чья транскрипция контролируется стероидным гормоном 20-гидроксиэкдизоном (20E) (Pascual-Garcia et al. 2017). Недавно было обнаружено, что один из компонентов комплекса ядерной поры, белок Nup93, присутствует не только на энхансерах, но и на регуляторных “PRE”-элементах, являющихся стартовой точкой для распространения репрессивных белков группы Polycomb (Gozalo et

al. 2020). Мы предположили, что Nup93 может быть важен для механизма регуляции транскрипции 20E-зависимых генов *Drosophila melanogaster* (в частности, их репрессии). С целью проверки данной гипотезы нами были получены и аффинно очищены антитела к белку Nup93. Антитела распознавали в ядерном белковом экстракте клеток дрозофилы единственный белок размером около 90 кДа. При помощи ко-иммунопреципитации мы показали, что белки Nup93 и экдизоновый рецептор EcR взаимодействуют в отсутствие экдизона. То есть, белок Nup93 действительно может быть вовлечен в процесс репрессии транскрипции 20E-зависимых генов в отсутствие гормона. На материале слюнных желез белых предкуколок дрозофилы нами был проведен ChIP-Seq анализ с использованием полученных антител к белку Nup93. Мы обнаружили, что Nup93 действительно присутствует в локусах 20E-зависимых генов дрозофилы. Преимущественными сайтами его локализации являются «паузированные» промоторы и инсуляторы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-14-00184).

УЧАСТИЕ МИШЕНЬ-ОПОСРЕДОВАННОЙ ДЕГРАДАЦИИ МИРНК В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *DROSOPHILA*

Марфина С.В.^{1,2}, Михалева Е.А.¹, Акуленко Н.В.¹, Рязанский С.С.^{1*}

¹ *Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия*

² *Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия*

E-mail: s.ryazansky@gmail.com*

МикроРНК (миРНК) – короткие РНК, длиной порядка 20-23 нт, которые в комплексе с белком Ago распознают комплементарную мРНК-мишень и вызывают её разрушение или ингибирование

трансляции. Напротив, при “неканоническом” связывании со специальной мРНК комплекс Ago-миРНК распознается мультибелковым убиквитин-лигазным комплексом ZSWIM8/CRL, что приводит к протеолизу Ago и деградации миРНК. Этот недавно обнаруженный процесс получил название TDMD, или мишень-опосредованная деградация миРНК (target-mediated microRNA degradation), биологическая роль которого в настоящее время изучена недостаточно. В данной работе мы изучаем роль TDMD в регуляции сигнального пути Notch, который играет важную роль в органогенезе и дифференцировке клеток. Индукция Notch-пути запускает каскад реакций, приводящих к активации транскрипции ряда генов-мишеней, включая, прежде всего, гены семейств E(spl)-C и Brd-C.

Для исследования TDMD в культуре соматических клеток яичников *Drosophila melanogaster* OSC нами был осуществлен нокаут гена *Dora*, гомолога *ZSWIM8*. Анализ транскриптома в клетках *Dora*KO показал дерепрессию ряда миРНК, включая miR-7, а также снижение экспрессии гена *Tom*, подтвержденной с использованием репортерной конструкции. Поскольку *Tom* относится к семейству Brd-C, мы предположили, что TDMD участвует в регуляции Notch-пути. Мы показали, что в норме индукция Notch-пути в OSC приводила к активации транскрипции гена *Tom* и всех проверенных генов семейства E(spl)-C, включая *E(spl)-m1*, *E(spl)-m3*, *E(spl)-m5*, *E(spl)-m2* и *E(spl)-m7*, тогда как при *Dora*KO этого не наблюдалось. Транскрипты *E(spl)-m1*, *E(spl)-m3*, *E(spl)-m5* и *Tom* содержат в своих 3'-НТО сайты связывания TDMD-регулируемой miR-7, в то же время эти сайты не содержатся в транскриптах *E(spl)-m2* и *E(spl)-m7*. Таким образом, мы предполагаем, что TDMD может модулировать активность сигнального пути Notch как прямо через miR-7-зависимую регуляцию экспрессии генов-мишеней Notch, так и за счёт миРНК-зависимой регуляции других компонентов молекулярного каскада Notch-пути.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ "Курчатовский институт".

**МОНОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА ТНР-1 КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ
ИЗУЧЕНИЯ АКТИВНОСТИ МИКРОРНК ТРЕМАТОД
OPISTHORCHIS FELINEUS В РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ
ЧЕЛОВЕКА**

Медведева Е.В.^{1*}, Лишай Е.^{1,2}, Пахарукова М.Ю.^{1,2}

¹ *Новосибирский государственный университет, Новосибирск
Россия,*

² *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

E-mail: tulenfedorovich@gmail.com*

Малые некодирующие РНК, включая микроРНК, регулируют экспрессию генов, влияя на стабильность целевых мРНК. Паразитические организмы также выделяют микроРНК в составе внеклеточных везикул, способны проникать в клетки человека и модулировать иммунный ответ. Механизмы, с помощью которых трематоды *Opisthorchis felineus* подавляют острое воспаление, регулируют ответ иммунной системы не изучены.

Цель работы: Выявление малых РНК внеклеточных везикул трематод, проявляющих специфические биорегуляторные свойства в отношении моноцитов человека ТНР-1.

С помощью флуоресцентной и конфокальной микроскопии в работе показано, что клетки ТНР-1 поглощают внеклеточные везикулы трематод. ДНК-библиотеки из малых РНК внеклеточных везикул *O. felineus* были секвенированы 1X50 п.н (BGI, Китай), проведен биоинформатический анализ полученных данных. В составе внеклеточных везикул определены мажорные микроРНК: Ofe-Mir-277-P2_3p, Ofe-Mir-71-P1_5p, Ofe-Bantam_3p, Ofe-Mir-10-P1_5p, Ofe-Mir-219_5p, Ofe-Mir-7-P1_5p, проведен их эволюционный анализ с помощью базы данных miRBase, показано наличие как консервативных, так и специфичных для трематод молекул. Это позволяет предположить, что микроРНК *O. felineus* могут действовать на те же гены-мишени, что и их человеческие гомологи. Гены мишени в геноме человека были предсказаны с помощью программ TargetScan, miRDB, а также RNAhybrid.

После трансфекции моноцитов человека ТНР-1 синтезированными аналогами мажорных микроРНК трематод исследованы уровни

экспрессии предсказанных генов-мишеней в геноме человека с помощью метода ПЦР в реальном времени, а также проведено исследование поляризационного ответа TBP-1 с помощью проточной цитометрии. В работе впервые показана роль микроРНК *O. felinus* в регуляции экспрессии генов человека.

Работа выполнена с использованием благотворительного пожертвования ООО «Компания Хеликон».

**ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ESRRa НА
ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК
МЕЗЕНХИМНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

**Ныров В.А. *, Смирнова Д.В., Переплетчикова Д.А.,
Малашичева А.Б.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: v.nyrov@incras.ru*

В настоящее время важной проблемой являются патологические изменения в опорно-двигательной и сердечно-сосудистой системах. Снижение уровня эстрогена может приводить к развитию остеопороза. В развитых странах остеопорозу подвержены от 1 до 8% мужчин и от 9 до 38% женщин. В то же время патологическая остеогенная дифференцировка интерстициальных клеток аортального клапана в разы чаще затрагивает мужчин. Во многих случаях процесс патологической остеогенной дифференцировки схож с нормальной дифференцировкой остеобластов. Исследования показали, что в остеобластах, остеоцитах и остеокластах присутствуют различные эстрогеновые рецепторы, которые оказывают влияние на процессы остеогенной дифференцировки. Однако, помимо них также присутствует экспрессия некоторых близких к ним рецепторов, одним из которых является эстроген-связанный рецептор альфа (ESRRa, NR3B1), относящийся к группе ядерных рецепторов, которые отличаются возможностью оказывать влияние на экспрессию.

В данном исследовании проводился анализ регуляции экспрессии ESRRa в клетках мезенхимного происхождения на их остеогенную дифференцировку. Регуляция экспрессии осуществлялась путем

трансдукции лентивирусными частицами, несущими нуклеотидную последовательность ESRRa и методом РНК-интерференции путем трансдукции лентивирусными частицами, несущими короткую шпилечную РНК. Также производилась инактивация ESRRa путём добавления в культуральную среду 10 мкМ синтетического ингибитора ERRa ХСТ-790. Остеогенная дифференцировка осуществлялась добавлением 100 нМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбиновой кислоты и 10 мМ β-глицерофосфата в культуральную среду. Эффективность остеогенной дифференцировки была оценена при помощи окраски ализариновым красным.

Нокдаун ESRRa в клетках мезенхимного происхождения приводит к существенному снижению остеогенной дифференцировки, в то время как увеличение экспрессии практически не влияет на дифференцировку. В случае добавления ХСТ-790 в клетки, трансдуцированные лентивирусной конструкцией, повышающей экспрессию ESRRa, существенных изменений уровня дифференцировки по отношению к контролю не произошло.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ проекта 23-15-00320).

ЭФФЕКТИВНАЯ КОРРЕКЦИЯ СПЛАЙСИНГА ГЕНА *SMN2* ПОСЛЕ ДОСТАВКИ ИНТЕРПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ В КЛЕТОЧНУЮ МОДЕЛЬ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ

Палагина М.А.^{1,2*}, Маретина М.А.¹, Киселев А.В.¹

¹ *Научно-исследовательский институт акушерства,
гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-
Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: m.palagina@mail.ru*

Спинальная мышечная атрофия (СМА) — наследственное нейромоторное заболевание, которое характеризуется прогрессивной дегенерацией нейронов передних рогов спинного мозга,

сопровождающееся прогрессирующей мышечной слабостью. В настоящее время коррекция сплайсинга гена *SMN2* является одним из ключевых методов лечения СМА. Используемые антисмысловые РНК-олигонуклеотиды, стимулирующие включение 7 экзона пре-мРНК гена *SMN2*, предназначены для интратекального введения пациентам. Препараты с данным способом ведения имеют ограничения и сложности в применении. Использование невирусной доставки антисмысловых олигонуклеотидов позволит перейти от интратекальной инъекции к инфузионному введению данных препаратов.

Целью работы является изучение тройных полиэлектролитных комплексов антисмысловых РНК-олигонуклеотидов с катионными и анионными пептидами, как средств коррекции сплайсинга гена *SMN2*. В качестве носителей антисмысловых олигонуклеотидов были использованы невирусные пептидные носители (Egorova et al., 2020), и отрицательно заряженное пептидное покрытие, модифицированное лигандом к интегрину $\alpha_v\beta_3$ (Egorova et al., 2023). Была проведена трансфекция в присутствии фетальной бычьей сыворотки клеточной культуры фибробластов, полученной от пациентов со СМА II типа. Методом полуколичественной флуоресцентной ОТ-ПЦР с фланкирующими праймерами амплифицировали фрагмент кДНК с 6 по 8 экзона *SMN2* (Maretina et al., 2022). Для оценки токсических свойств комплексов *in vitro* использовали резазуриновый тест.

Было получено статически значимое повышение доли полноразмерных транскриптов *FL-SMN* после доставки терапевтических антисмысловых РНК-олигонуклеотидов в клеточную модель СМА. Токсические свойства комплексов не отличались от интактного уровня.

Разработанные тройные интерполиэлектролитные комплексы являются перспективными средствами доставки сплайсинг-корректирующих антисмысловых РНК-олигонуклеотиды в условиях, приближенных к физиологическим.

Работа выполнена в рамках проекта «Многоцентровая исследовательская биоресурсная коллекция “Репродуктивное здоровье человека”» (соглашение № 075–15-2021-1058 от 28.09.2021).

УВЕЛИЧИВАЕТ ЛИ ОБРАЗОВАНИЕ G-КВАДРУПЛЕКСОВ ПЛОТНОСТЬ МУТАЦИЙ В ИХ ОКРЕСТНОСТЯХ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА?

Панова В.В.^{1*}, Алексеевский А.В.^{2,4}, Зверева М.Э.¹

¹ *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

² *Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия*

³ *Научно-исследовательский институт системных исследований Российской академии наук, Москва, Россия*
E-mail: nooroka@fbf.msu.ru*

В основе раковых процессов лежит широкий спектр мутаций соматических и зародышевых клеток. G-квадруплекс (G4) связывается с компонентом MutL системы репарации MMR, что снижает эффективность репарации (Pavlova et al.,2022).

Мы предполагаем, что образование G4 приводит к увеличению частоты мутаций в их окрестностях. У людей с множественной миеломой соматические мутации в G4-областях генома чаще встречаются в плазматических клетках опухоли (Zhuk et al.,2024).

Экспериментальные данные по G-содержащим регионам взяты из Marsico et al.,2019, (GEO: GSM3003539, GSM3003540) и представлены в виде координат 428624 и 1285463 пиков ДНК-полимеразы (Observed G-quadruplexes, OQs), останавливающейся во всем геноме человека (сборка GRCh37). Образцы из GSM3003539 содержат K⁺, который стабилизирует структуры G4, а образцы из GSM3003540 содержат еще пиридостатин (PDS), специфически стабилизирующий G4-структуры.

Оба эксперимента основаны на остановке полимеразы образованием G4.. Есть ошибочные прогнозы: было обнаружено 3387 OQS с GC-составом 0% в GSM3003539 и 9840 OQ в GSM3003540. Последовательности пиков проверялись на наличие паттернов G₃₊L₁₋-7G₃₊L₁₋-7G₃₊L₁₋-7G₃₊. К каждой найденной последовательности G4 добавлялось 10 нуклеотидов на 5' и 3' концах. Контроль – последовательные интервалы в экспериментальных данных с длиной, равной средней длине G-квадруплекса в каждой хромосоме,

и GC-составом $\geq 50\%$. Было найдено 186490 квадруплексов для GSM3003539 и 325172 для GSM3003540.

В G4 плотность мутаций по dbSNP выше для GSM3003539 (р-значение = $1.8e-07$, тест Манна-Уитни)

Плотность мутаций по COSMIC (некодирующие варианты) не имеет значимых различий у GSM3003539. У GSM3003540 плотность в квадруплексах меньше, чем плотность в контрольных регионах, что может быть связано с нарушением структуры генома в опухолевой клетке.

Код проекта: https://github.com/nooroka/mutation_density_pipeline_v2
Работа была выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00161).

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ ХРОМОСОМЫ W НА СТАДИИ ЛАМПОВЫХ ЩЁТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ РНК-seq И FISH

**Плотников В.А.¹, Куликова Т.В.¹, Федоров А.В.¹,
Щелкунов М.И.^{2,3}, Федотова А.В.^{2,4}, Красикова А.В.^{1*}**

¹ *Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

² *Центр коллективного пользования в области геномики,
Сколковский институт науки и технологии, Москва,
Россия*

³ *Институт проблем передачи информации имени
А.А. Харкевича РАН, Москва, Россия*

⁴ *Московский государственный университет им.
М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: alla.krasikova@gmail.com*

На хромосоме W домашней курицы аннотировано 28 белок-кодирующих генов, каждый из которых имеет гомолог на хромосоме Z. Экспрессия этих генов обнаруживается в различных тканях (Bellott et al., 2017). В женских первичных половых клетках наблюдается неожиданное увеличение экспрессии 21 пары генов Z-W, что может быть проявлением механизмов определения пола

(Ichikawa et al., 2022). В настоящем исследовании мы проследили активность пар генов Z-W в дальнейшем развитии: сохраняется ли их экспрессия в растущих ооцитах на стадии диплотены в профазе мейоза I, а также какова судьба этих транскриптов после формирования зиготы. Мы проанализировали данные секвенирования тотальной и поли(А) РНК, выделенной из ядер и цитоплазмы ооцитов курицы на стадии хромосом типа ламповых щёток, выровненные на версию генома *GGswu1* (сборка от теломеры к теломере) (Krasikova et al., 2024). Мы показали, что большинство пар генов Z-W сохраняет транскрипционную активность в ооцитах на стадии ламповых щеток. Транскрипция нескольких генов на хромосоме W была подтверждена методом РНК-FISH. Для этого мы разработали протокол синтеза зондов при помощи ПЦР в качестве альтернативы зондам на основе ВАС-клонов. С помощью РНК-FISH с зондами на основе ПЦР-продуктов мы уточнили данные секвенирования РНК для ряда генов хромосомы W, таких как *hnRNPK*. Наконец, мы проанализировали транскриптом эмбрионов на ранней стадии развития (EGK.III) (Hwang et al., 2018) и выявили наследование сплайсированной мРНК для пар генов Z-W. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования в области геномики (Сколтех) и Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» (Санкт-Петербургский государственный университет).

**МУЦИНЫ СТРЕКАЮЩИХ СОДЕРЖАТ ДОМЕН,
ИНГИБИРУЮЩИЙ АМИЛАЗЫ**

**Попкова Д.В.^{*}, Отставных Н.Ю., Синцова О.В., Гладких И.Н.,
Исаева М.П., Лейченко Е.В.**

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
ДВО РАН, Владивосток, Россия
E-mail*: daria.vladipo@yandex.ru*

Сахарный диабет в наши дни занимает лидирующие позиции в рейтингах самых опасных и быстро распространяющихся заболеваний, и часто является причиной смерти в связи с высоким

риском развития осложнений со стороны всех систем органов. Кроме того, с используемыми в терапии препаратами связано большое количество побочных эффектов, в связи с чем актуальным является поиск новых источников биологически активных соединений, влияющих на вовлеченные в метаболизм углеводов мишени (Lin et al., 2020). Пептидный ингибитор α -амилазы, магнификамид, выделенный из морской анемоны *Heteractis magnifica* является перспективным кандидатом для создания на его основе нового эффективного лекарственного препарата (Sintsova et al., 2018; Sintsova et al., 2019). Магнификамид относится к группе β -дефензинов, широко представленных среди Стрекающих, однако плохо изученных с точки зрения ингибирующего действия по отношению к α -амилазам (Tysoe et al., 2016).

С применением методов молекулярной биологии, в частности быстрой амплификации кДНК (RACE) было изучено разнообразие гомологов магнификамида и обнаружены 7 его природных изоформ. Впервые установлена экзон-интронная структура генов магнификамидов и выявлено сохранение интронов в кодирующей зрелый пептид области. Удержание интрона предположительно играет роль в увеличении разнообразия изоформ ингибиторов и их неофункционализации в щупальцах морских анемонов.

Наряду с этим, в муцинах морских анемонов в базах данных сервиса NCBI был обнаружен домен (40 а.о.), сходный с доменом (44 а.о.) ингибиторов α -амилазы. Поиск TBLASTN позволил выявить 34 последовательности ингибиторов и 14 последовательностей муцинов с гомологичным ингибиторным доменом. В результате филогенетического анализа морские анемоны были разделены на две группы по наличию только β -дефензин-подобных ингибиторов α -амилазы или совместно с их доменами в составе муцинов. Анализ изоэлектрических точек (pI) найденных пептидов позволил предположить, что ингибиторы с $pI = 5-6$ участвуют в регуляции активности α -амилазы, тогда как ингибиторные домены в муцинах с pI около 9 отвечают за защиту углеводных групп от их гидролиза α -глюкозидазами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда (проект № 21-74-20147).

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПРОМОТОРА ГЕНА *FAP* ВО ВРЕМЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Селина П.И.^{1*}, Плешкан В.В.^{1,2}

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

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

E-mail*: greenapple_35@mail.ru

Белок активации фибробластов (FAP) является одним из ключевых компонентов реактивной стромы, которые модулируют структуру внеклеточного матрикса. Накопленные в настоящее время данные о функционировании как самого белка FAP, так и его гена, свидетельствуют о значительной роли в различных процессах, при которых наблюдается изменение структуры тканей, в частности, при регенеративных и воспалительных процессах, при формировании фиброзов и онкологических образований, а также эмбриональном развитии. Следует отметить, что функционирование гена *FAP* позвоночных животных и его роль во время эмбриогенеза недостаточно изучены.

Для исследования эффективности функционирования промотора гена *FAP* человека на организменном уровне мы использовали эмбриональную модель *Danio rerio*. В оплодотворенные яйцеклетки до первого деления дробления вводили плазмидные генетические конструкции, содержащие репортерный ген люциферазы светлячка *Photinus pyralis* или ген зеленого флуоресцентного белка EGFP, которые находились под управлением фрагмента промоторной последовательности гена *FAP* человека длиной 2144 пн (–2026/+118 от сайта начала транскрипции нативного гена).

В результате проведенного исследования было впервые выявлено наличие активности промотора FAP в популяциях различных по морфологии клеток модельного организма, среди которых эпителиальные, мышечные клетки и клетки внешней оболочки хорды. Показано эффективное накопление маркерных белков под

управлением промотора *FAP* у части животных, которое было ассоциировано с наличием у особей патологий формирования хорды, сопровождающихся деформацией скелетно-мышечных тканей. Полученные данные могут указывать на функциональную роль нативного гена *FAP* в развитии скелетно-мышечных тканей позвоночных животных.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ХЛОРОПЛАСТНОГО ГЕНОМА У ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ ГИБРИДОВ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ ПЛОИДНОСТИ

Соколюк А.В.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

E-mail: a.sokolyuk@igc.by*

Генезис аллополиплоидных форм, к которым относится большинство высших растений, сопровождается кардинальными преобразованиями и модификациями ядерного генома (Wendel, 2000; Feldman, Levy, 2005). В то же время образование аллополиплоидов всегда сопряжено с нахождением одного или более ядерных геномов в чужеродной цитоплазме, что приводит к ядерно-цитоплазматическому конфликту, в ходе разрешения которого структурным модификациям может подвергаться также пластом. В отличие от преобразований ядерного генома этот аспект стабилизации аллополиплоидных форм изучен крайне мало.

Цель исследования: провести полногеномное секвенирование хлоропластных ДНК гексаплоидных и тетраплоидных пшенично-ржаных гибридов (тритикале) и на основе полученных данных оценить влияние структурной организации ядерного генома на изменчивость пластома в ходе их коадаптации.

В работе представлены результаты NGS секвенирования хлоропластной ДНК 10 сортов 6х- и 9 линий 4х-тритикале. Описаны мутации, выявленные в кодирующих районах хпДНК пшенично-ржаных гибридов в ходе сравнительного анализа полученных

нуклеотидных последовательностей с референсным геномом *Triticum aestivum*. Установлено, что в кодирующих районах хп-ДНК 6х-тритикале структурным изменениям подверглись 12 генов. Наибольшим полиморфизмом характеризовались ген *atpA* (27 мутаций), ген *ndhB* (11 мутаций) и ген *rps7-A* (4 мутации).

При анализе последовательностей хп-ДНК линий тетраплоидных тритикале выявлены изменения в структуре хп-ДНК 18 генов. Наибольшая изменчивость характерна для семейства генов *ndh* (14 мутаций), генов *rps4* и *psbE* (по 4 мутации), гена *rpoC2* (3 мутации). При сравнении пластомов 4х-тритикале между собой установлено, что межлинейная изменчивость тетраплоидных гибридов существенно выше, чем межсортовая гексаплоидных форм. Об этом свидетельствует присутствие у 5 линий индивидуальных мутаций, тогда как у 6х-тритикале такие мутации были отмечены лишь у одного сорта.

Полученные данные позволяют сделать вывод о значительном влиянии структурной организации ядерного генома, а именно уровня пloidности пшенично-ржаных амфидиплоидов, на изменчивость пластома как в количественном, так и качественном отношении.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Биотехнологии-2» (задания 2.1.4).

МИКРОБИОМ КРОВИ ПРИ ТЯЖЕЛЫХ ФОРМАХ КОРОНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Тимофеев Д.А.^{1*}, Куприянова Е.А.¹, Маркелова М.И.¹,
Гайнатуллина Л.Р.², Николаева И.В.², Григорьева Т.В.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Казань, Россия

E-mail*: dio2aurum@gmail.com

Введение. SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) является возбудителем новой коронавирусной болезни COVID-

19, повлекшей за собой одну из крупнейших пандемий в современной истории (Morens *et al.*, 2020). Методы секвенирования нового поколения (NGS) помогли отслеживать распространение заболевания, а также понять влияние различных факторов, в том числе микробиома, на патогенез и исход заболевания. В подавляющем большинстве подобных исследованиях изучалась микробиота кишечника, анализ микробиоты крови же проводился лишь в одной работе (Kypros Dereschuk *et al.*, 2021). В связи с этим, цель данной работы – охарактеризовать бактериальный состав крови пациентов с тяжелым течением SARS-Cov2.

Материалы и методы. В исследуемую группу вошли 10 пациентов с коронавирусной инфекцией средней, тяжелой или крайне тяжелой степени. От всех пациентов были получены образцы крови. Из образцов крови всех исследуемых лиц проводили выделение микробной ДНК, была выполнена подготовка библиотек переменного участка v3–v4 гена 16S рРНК, а затем секвенирование на платформе Illumina MiSeq.

Результаты. Таксономический анализ полученных в ходе секвенирования последовательностей показывает, что доминирующими филами в микробиоме крови среди нашей выборки являются *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Firmicutes* и *Bacteroidota* – 8.9%, 6.3%, 5.3% и 3.7%, соответственно. На уровне семейств преобладают: *Steroidobacteraceae*, *Nitrococcaceae*, *Marinococcaceae*. На уровне родов - *Sphingomonas*, *Saccharomonospora*, *Novosphingobium*, *Aquabacterium*, *Staphylococcus*.

Представители данных семейств и родов бактерий в ранее проведенных исследованиях были выявлены в ассоциации с различными заболеваниями, например, внутрибольничными инфекциями (Kevin B. Laupland *et al.*, 2022), в крови больных диабетом второго типа (Jing Qiu *et al.*, 2019), а также были ассоциированы с тяжестью заболевания COVID-19 (Kypros Dereschuk *et al.*, 2021). Выявленные в ходе данной работы бактерии и их влияние на патогенез коронавирусной инфекции требуют дальнейшего изучения.

ВЫЯВЛЕНИЕ РОЛИ ОНКОГЕН-ИНДУЦИРОВАННОЙ СЕНЕСЦЕНЦИИ В РАЗВИТИИ РАКА ЭНДОМЕТРИЯ

Торопов А.Л. *, Дерябин П.И., Бородкина А.В.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: toropov.01@bk.ru*

Рак эндометрия (РЭ), внутренней оболочки матки, за последние годы приобрел статус самого распространенного гинекологического рака, обогнав рак шейки матки. Несмотря на растущие темпы заболеваемости, механизмы прогрессирования РЭ остаются малоизученными. Большое количество данных подтверждает роль онкоген-индуцированной сенесценции клеток как барьера онкогенеза. Часть исследований, однако, показывает, что сенесцентные клетки способны индуцировать прогрессию опухолей с помощью различных механизмов. Чтобы установить, какую роль сенесцентные клетки играют в развитии рака эндометрия, мы проанализировали открытые данные РНК-секвенирования одиночных клеток (scRNA-seq) образцов эндометрия, отражающих поэтапный процесс онкогенеза.

Данные scRNA-seq были получены из базы данных NCBI SRA (SRP349751) и включали 15 образцов: 5 - нормального эндометрия, 5 - атипичной гиперплазии эндометрия и 5 - эндометриоидной карциномы эндометрия. Предварительная обработка данных, аннотация типов клеток и анализ дифференциальной экспрессии генов были проведены с использованием программного пакета Seurat. Для выявления сенесцентных эпителиальных клеток использовались показатели обогащения по генной сигнатуре сенесценции Брозенса (Rawlings, Brosens et al., 2021); для идентификации раковых клеток оценивались уровни CNV (вариации числа копий генов) и MSI (микросателлитной нестабильности) с помощью инструментов inferCNV и MSIsensor-RNA.

Используя генную сигнатуру сенесценции, мы идентифицировали субпопуляцию сенесцентных эпителиальных клеток эндометрия, которая выявлялась как на ранних, так и терминальных стадиях развития карциномы. Более того, сенесцентные клетки присутствовали почти во всех образцах гиперплазии и карциномы

эндометрия, несмотря на гетерогенность по уровню CNV и MSI между опухолевыми образцами. Также мы выявили транскрипционные изменения, происходящие в сенесцентных клетках по мере развития рака, которые были связаны с изменением метаболизма клеток, а также экспрессией неклассических молекул главного комплекса гистосовместимости.

Таким образом, мы обнаружили, что развитие рака эндометрия связано с появлением субпуляции сенесцентных эпителиальных клеток, которые предположительно играют роль в модуляции иммунного ответа против опухолевых клеток.

**НАРУШЕНИЯ ТОЛЕРАНТНОСТИ МАКРОФАГОВ К
ЛИПОПОЛИСАХАРИДУ У ПАЦИЕНТОВ С ИБС
Чегодаев Е.С.^{1*}, Попов М.А.², Масленников Р.А.², Журавлёв
А.Д.¹, Верхова С.С.¹, Никифоров Н.Г.^{1,4}**

¹ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

² Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия,

³ Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

E-mail: egozavr-ch@mail.ru*

Введение: Атеросклероз и, в частности, ишемическая болезнь сердца (ИБС) – это многофакторное заболевание с медленным прогрессированием, которое сопровождается накоплением липидов, белков и клеток различных типов, образуя атеросклеротические бляшки. Циркулирующие моноциты крови привлекаются в очаг воспаления и дифференцируются в макрофаги, секретируя провоспалительные цитокины и хемокины для привлечения других клеток и завершения воспаления. Однако, при атеросклерозе воспаление не разрешается, а переходит в хроническую форму. Известно, что макрофаги снижают свою чувствительность к LPS при повторном воздействии, для защиты тканей от высоких концентраций цитокинов, формируя тем самым толерантность. Мы решили проверить нарушена ли толерантность макрофагов и

изучить экспрессию генов воспаления в циркулирующих моноцитах.

Методы: CD14⁺ моноциты были выделены из крови пациентов с/без ИБС. Для оценки экспрессии генов проводили секвенирование РНК (RNAseq) моноцитов. Для оценки толерантности макрофагов к LPS, выделенные клетки стимулировали LPS в первый и в шестой день. Способность макрофагов формировать толерантность к LPS оценивали по секреции цитокинов TNF α , IL1beta, IL6, IL-10, IL8, CCL2, в супернатантах клеточных культур.

Результаты: Уровень секреции CCL2 после двукратной стимуляции LPS был выше в макрофагах от пациентов с ИБС, в то время как, уровень секреции IL-8 был выше в клетках пациентов без ИБС. Результаты RNAseq показали, что в моноцитах от пациентов с ИБС повышалась экспрессия 53-х генов и понижалась экспрессия 21-о гена относительно клеток от пациентов без ИБС.

Выводы: Мы обнаружили, что толерантность макрофагов к LPS у пациентов с ИБС по секреции хемокинов IL8, CCL2 была нарушена. Повышенная секреция CCL2 может быть причиной хронизации воспаления за счёт привлечения моноцитов в очаг воспаления. В моноцитах пациентов с ИБС была повышена экспрессия генов вовлечённых в иммунную регуляцию клеток, что говорит о возможных патологических изменениях на этапе их дифференцировки. При поддержке РФФИ #22-15-00273

**ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ H3K9me3 В
ДВУХКЛЕТОЧНЫХ ЗАРОДЫШАХ МЫШЕЙ,
РАЗВИВАЮЩИХСЯ *IN VITRO* В ПРИСУТСТВИИ
БИСФЕНОЛА А И ЛАКТОФЕРРИНА**

Чельшева Л.А.*, Нонишвили Е.М., Паткин Е.Л.

Институт экспериментальной медицины,

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: ofeliyafutman@gmail.com*

Актуальность. Репрессорные модификации гистонов H3K9me3 и H3K27me2 – являются одними из ключевых маркеров

транскрипционно-неактивного хроматина. Ранее, нами было показано, что воздействие бисфенола А (БФА) в предимплантационном периоде приводит к полногеномному снижению (в 1,3 раза) количества модификаций гистонов H3K27me2 по сравнению с контролем. На сегодняшний день нет данных о роли лактоферрина (ЛФ), как нормализатора эпигеномных нарушений под влиянием токсикантов.

Цель – изучить влияние БФА и сочетанного действия БФА и апо-лактоферрина (апо-ЛФ) на модификацию гистонов H3K9me3, которая является маркером HP1-зависимого гетерохроматина.

Материал и методы. Сравнение эпигеномного статуса зародышей проводили через 24 часа культивирования в среде, содержащей 50 мкМ БФА и 50 мкМ БФА + 50 мкг/мл апо-лактоферрина, путем измерения интенсивности флуоресценции антител к H3K9me3 интерфазных ядер бластомеров 2-кл зародышей мыши.

Результаты и обсуждение. Воздействие БФА на зародыши в предимплантационном периоде приводит к общегеномному **снижению** (в 1,4 раза) количества репрессивных модификаций гистонов H3K9me3 по сравнению с контролем ($p < 0.05$). Добавление в среду с БФА апо-ЛФ человека **снижало** (в 1,5 раз) негативный эффект БФА, тем самым приблизив значения общегеномного содержания H3K9me3 к значениям интактного контроля. Это может быть связано со способностью ЛФ взаимодействовать с ферментами, участвующими в процессах метилирования.

Заключение. Таким образом, наши результаты *in situ* показали, что воздействие БФА на двухклеточные зародыши нарушает процесс гетерохроматинизации в ядрах бластомеров, а апо-ЛФ человека частично нивелирует эпитоксическое воздействие БФА и приводит к нормализации уровней эпигенетических нарушений, индуцированных БФА.

Ключевые слова: 2-кл зародыши мыши; бисфенол А; апо-лактоферрин человека, H3K9me3.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ: НИР № FGWG-2022–0012 (рег. № НИОКТР 122020300196-4).

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СЕРТОНИНА НА РАЗВИТИЕ ГИПОТАЛАМУСА КРЫС

Чикина Е.А.^{1*}, Романов Р.А.²

¹ *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Москва, Россия*

² *Медицинский университет Вены, Вена, Австрия
E-mail*: chikina.evgeniia@gmail.com*

Множество факторов оказывают воздействие на организм в течение эмбрионального развития, приводя к изменениям в строении и функциях различных органов и систем. В частности, было показано, что при стрессе у беременных самок грызунов повышается уровень серотонина (5HT), приводя к изменениям в строении надпочечников у потомства, что влияет на их поведенческие реакции уже во взрослом возрасте (Kameneva et al, 2022). Однако, влияние серотонина на нейрогенез, в том числе на развитие гипоталамуса, остается не вполне изученным вопросом.

В данной работе была использована фармакологическая модель, имитирующая повышенный уровень серотонина у матерей во время беременности. Таким образом, беременные самки крыс получали перорально предшественник серотонина в период интенсивного нейрогенеза (E11-14). Далее гипоталамусы крыс потомства изучались на уровне единичных клеток на 20 день эмбрионального и 28 день постнатального развития.

На 20 день эмбрионального развития были детектированы две траектории дифференцировки клеток, которые согласуются с известными данными об особенностях нейрогенеза гипоталамуса (Romanov et al, 2020). Сравнение с контрольными образцами показало разницу в экспрессии генов Wnt сигнального пути и транскрипционных факторов Nf κ B семейства, что может объяснять композиционные различия в клеточном составе. На 28 день постнатального развития была выявлена композиционная разница: повышение количества эпендимы, снижение доли предшественников олигодендроцитов, что может говорить об ускоренном развитии этих глиальных клеток. Кроме того, анализ на

уровне экспрессии генов показал, что под воздействием серотонина у потомства наблюдается увеличение количества зрелых миелинизирующих олигодендроцитов, которые значительно отличаются по своему липидному профилю от контрольных клеток. Происходят изменения в фосфолипидном метаболизме, снижается активность биосинтеза холестерина, что сказывается на структуре клеточных мембран.

Таким образом, в данной работе показано, что воздействие материнского серотонина во время беременности приводит к стойким изменениям в организации мозга, влияющим на дальнейшую судьбу потомков.

Работа поддержана грантом № 075-15-2021-1344.

**ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЛЕЙОМИОМЫ МАТКИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕВИРУСНОЙ СИСТЕМЫ
ДОСТАВКИ ГЕНОВ, ИНДУЦИРУЮЩИХ АПОПТОЗ**
Штыкалова С.В., Егорова А.А., Швед Н.Ю., Киселев А. В.*

*Научно-исследовательский центр акушерства,
гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта,
Санкт-Петербург, Россия*
E-mail: ankiselev@yahoo.co.uk*

Лейомиома матки (ЛМ) – наиболее распространенное доброкачественное новообразование женской репродуктивной системы. Развитие ЛМ ассоциировано с бесплодием и осложнениями при беременности. Возможность точной ультразвуковой локализации делает данное заболевание идеальной мишенью для применения подхода генной терапии, направленного на индуцирование апоптоза в опухолевых клетках.

Нами были разработаны катионные пептидные носители и анионное пептидное покрытие, модифицированное лигандом к интегрину $\alpha\beta 3$, для доставки плазмидной ДНК в клетки. Работа проведена на клетках карциномы поджелудочной железы человека PANC-1, клеточной модели ЛМ и фрагментах лейомиоматозных узлов (органотипическая модель ЛМ), полученных после миомэктомии.

Изучена стабильность нуклеопептидных полиплексов с анионным покрытием. Проведена оценка трансфекционной активности полиплексов с анионным покрытием при различных зарядовых соотношениях в экспериментах на клетках PANC-1. Выполнены эксперименты по трансфекции первичных клеток ЛМ и тканей лейомиоматозных узлов плазмидной ДНК с геном тимидинкиназы *HSV-TK* в составе полиплексов. Проведены инъекции полиплексов, несущих плазмидные ДНК с репортерными генами *GFP* и *lacZ*, в лейомиоматозные узлы с последующими анализом криотомных срезов на флуоресцентном микроскопе и биохимической оценкой активности бета-галактозидазы в гомогенизированной ткани, соответственно. Для анализа эффективности генной терапии, направленной на индукцию апоптоза, в лейомиоматозных узлах оценивали уровень экспрессии генов проапоптотических факторов *p53*, *Bax* и *DAXX*.

Анионное пептидное покрытие повышает стабильность полиплексов и способствует успешной трансфекции клеток в присутствии сыворотки. Оценка метаболической активности клеток и окрашивание трипановым синим показали снижение пролиферативной активности первичных клеток ЛМ после трансфекции полиплексами, несущими *HSV-TK*, и последующей обработкой ганцикловиром. На срезах узлов ЛМ после введения полиплексов с маркерным геном зарегистрировано специфичное свечение, соответствующее накоплению белка GFP. Биохимическая оценка активности бета-галактозидазы показала увеличение количества данного фермента в трансфецированных лейомиоматозных узлах, что свидетельствует об успешной трансфекции тканей ЛМ. Повышенная экспрессия генов *p53* и *DAXX* указывает на запуск апоптоза в тканях ЛМ после инъекций полиплексов с *HSV-TK*.

Разработанные пептидные носители являются перспективными средствами доставки ДНК в клетки ЛМ с целью генной терапии.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БЛОКАТОРОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА KcsA

Юнусова В.А.* , Орлов Н.А., Некрасова О.В., Кузьменков А.И.,
Феофанов А.В., Василевский А.А.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М.

Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: valentinaiunusova@gmail.com*

Белок KcsA является классическим модельным объектом для изучения структуры и механизмов работы калиевых каналов. Несмотря на широкое применение KcsA в структурной биологии, до сих пор известно лишь небольшое количество его лигандов. Одной из таких молекул является Hui1 — искусственный пептид, отобранный методом фагового дисплея из комбинаторной библиотеки, состоящей из производных токсина морской анемоны ShK. Поиск лигандов KcsA является важной задачей для дальнейших структурных исследований, а также интересен с точки зрения получения новых антимикробных препаратов.

Для поиска новых лигандов KcsA нами была разработана тест-система, основанная на вытеснении флуоресцентного конструкта eGFP-Hui1 из комплекса с каналом, экспонированным на поверхности сфероластов *Escherichia coli*. Слитный белок eGFP-Hui1 был получен в бактериальной системе экспрессии с дальнейшей очисткой хроматографическими методами. Мы подтвердили работоспособность системы: пептид Hui1 успешно вытесняет eGFP-Hui1 из комплекса с каналом. Затем мы приступили к поиску лигандов KcsA в животных ядах. Нами была протестирована широкая панель, включающая яды скорпионов, змей, пауков и морских анемонов. Искомая активность была обнаружена в яде среднеазиатской кобры *Naja oxiana*, песчаной эфы *Echis carinatus*, а также паука *Segestria* sp.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 22-74-10028).

Секция «Молекулярно-клеточные механизмы
функционирования нервной системы в норме
и при патологии»

**RECOMBINANT ANALOG OF HUMAN PROSTATIC STEM
CELL ANTIGEN: FUNCTION AND ROLE IN THE BRAIN**

**Che Yuqi¹, Shulepko M.A.¹, Bychkov M.L.², Kocharovskaya M.V.²,
Paramonov A.S.², Shenkarev Z.O.², Lyukmanova E.N.^{1,2*}**

¹ *Department of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen,
China*

² *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

E-mail: lyukmanova_ekaterina@smbu.edu.cn*

Prostate stem cell antigen (PSCA) belongs to the Ly6/uPAR protein family, which has a high diagnostic and prognostic value. Increased expression of PSCA was found in the cortex of patients with Alzheimer disease (by ~ 70 %) and in samples from patients with glioblastomas. Presently, role of PSCA in the body is unknown.

Herein, we developed the expression system for bacterial production of PSCA in the form of inclusion bodies with subsequent solubilization and refolding and studied its functional and structural properties. The spatial structure of recombinant PSCA was studied by solution NMR using unlabeled and ¹³C/¹⁵N-labeled protein samples. In contrast to predicted by Alpha fold structure, NMR analysis revealed that PSCA structure contains large disordered regions at the tips of the loops I and III and an unusual for Ly6/uPAR proteins gap of the β -sheet formed by the central loop II.

We didn't find correlation between PSCA mRNA expression and survival of patients with metastatic melanoma and glioblastomas, however, increased *PSCA* expression in glioblastomas relative to normal brain tissue corresponds to better survival prognosis. We studied the PSCA effect on proliferation, migration and invasion of U251 MG glioma and metastatic melanoma mel Kor and mel Si cells derived from patients. It was revealed that recombinant PSCA down-regulates growth and invasion of U251 MG cells, shows no effect on mel Kor cells, and slightly increases growth of mel Si cells. Perhaps, PSCA effect depends on the repertoire of target receptors expressed on the surface of tumor cells.

To understand possible effects from increased PSCA expression in the brain, we tested morphological changes of the primary neurons incubated with PSCA. Significant decreased dendritic spine density was revealed upon incubation with PSCA. Data obtained point on PSCA as an important regulatory protein in human body.

The work was supported by the Russian Science Foundation (project 24-14-00419).

ROLE OF LY6/UPAR PROTEINS IN THE BRAIN PATHOLOGY

Lyukmanova E.N.^{1,2}

¹ *Department of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen, China*

² *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

E-mail: lyukmanova_ekaterina@smbu.edu.cn

The Ly6/uPAR protein family gets its name from its two members, lymphocyte antigen-6 and urokinase-type plasminogen activator receptor. Members of the Ly6/uPAR family are characterized by the β -structured LU-domain (60-90 amino acids) stabilized by the system of highly conserved 4 disulfide bonds and containing three loops (“fingers”). This conservative spatial structure emphasizes the evolutionary importance of the Ly6/uPAR three-finger fold. Ly6/uPAR proteins were discovered in the wide diversity of species, and in humans they were found in the immune system, skin, brain, and reproductive system. Ly6/uPAR proteins are involved in regulation of many essential processes and influence the development of various pathologies.

Several Ly6/uPAR proteins are expressed in the CNS in the different brain regions. Little is known about their function, although, some of them target neuronal membrane receptors. Thus, Lynx1 potentiates nicotinic acetylcholine receptors in the brain, while others like Lypd6 and Lypd6b suppress it. Expression of the Ly6/uPAR proteins in the brain can change in various neurodegenerative pathologies. For example, Lynx1 and PSCA expression decreased and increased in Alzheimer disease,

respectively, while up-regulation of Lypd6 and Lypd6b expression associates with autism. The lecture will discuss new advances in understanding the role and function of some human Ly6/uPAR proteins in the brain with a particular focus on the cognitive processes in which they may be involved.

НЕЙРОРЕГЕНЕРАТИВНАЯ ТЕРАПИЯ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЫ: ПРОТЕЗИРОВАТЬ НЕЛЬЗЯ ВОССТАНОВИТЬ?

В.П. Баклашев^{1,2}

¹ *Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России,
Москва, Россия*

² *Федеральный научно-клинический центр специализированных
видов медицинской помощи и медицинских технологий
ФМБА России, Москва, Россия*

E-mail: baklaushev@fccps.ru

Ключевые слова: нейрорегенерация, репрограммирование, нейральные стволовые клетки, нейромодуляция

Современные стратегии реабилитации пациентов с тяжелыми поражениями ЦНС подразумевают адаптацию пациента к измененным условиям существования и максимально возможное сохранение качества жизни с помощью протезирования функции и изменения среды вокруг пациента с необратимо утраченными функциями. Современная регенеративная медицина пока не в состоянии предложить другую парадигму реабилитации неврологических пациентов. Возможно ли кардинальное изменение ситуации в будущем, или решение данной проблемы будет осуществлено с помощью усовершенствования нейропротезирования (нейроинтерфейс-управляемые экзоскелеты, бионические протезы, дополненная реальность и пр.)?

Ограниченные возможности регенерации ЦНС у человека требуют создания новых источников нейральных стволовых клеток (НСК) для регенерации. Таким источником могут быть репрограммированные в нейральном направлении аутологичные

соматические клетки. В течение последней декады активно разрабатываются технологии прямого пронеуронального репрограммирования или трансдифференцировки, минующей стадию клеток с индуцированной плюрипотентностью. Предпринимаются весьма интересные попытки прямого репрограммирования *in situ*, т.е. непосредственно в очаге патологии. Краеугольной проблемой успешной регенеративной терапии церебральной и спинальной травмы является предотвращение развития грубого соединительнотканного рубца на месте травмы, препятствующего регенерации проводящих путей спинного мозга. С целью его преодоления разрабатываются различные скаффолды, облегчающие прорастание аксонов, а также испытываются различные генотерапевтические средства на основе аденоассоциированных вирусов (AAV), несущих последовательности регуляторных белков или siRNA для нокдауна ключевых факторов образования рубца или наоборот, активации ремоделирования внеклеточного матрикса и репаративной регенерации. Крайне интересными и перспективными при заболеваниях и травмах ЦНС представляются комбинированные подходы, включающие репрограммирование, предотвращение образования рубца и эпидуральную электрическую стимуляцию спинного мозга, активирующую так называемые SPG нейроны и способствующую восстановлению локомоторной функции. В настоящем докладе будут освещены результаты наших собственных исследований по прямому репрограммированию с помощью AAV-NeuroD1 и комбинированной терапии спинальной травмы с помощью трансплантации стволовых клеток и нейромодуляции на модели крупных лабораторных животных.

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ КИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ
LRRK2 НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМНОГО ФЕРМЕНТА
ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ (GCASE)
В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ МАКРОФАГОВ ПАЦИЕНТОВ
С ДИСФУНКЦИЕЙ GCASE**

**Башарова К.С.^{1*}, Безрукова А.И.^{1,2}, Безруких В.А.³, Байдакова
Г.В.⁴, Милюхина И.В.^{1,5}, Захарова Е.Ю.⁴, Пчелина С.Н.^{1,2},
Усенко Т.С.^{1,2}**

¹ *Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.*

Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский
университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Национальный Медицинский Исследовательский Центр им. В.А.
Алмазова, Санкт-Петербург, Россия*

⁴ *Медико-генетический научный центр имени академика Н.П.
Бочкова, Москва, Россия*

⁵ *Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-
Петербург, Россия*

E-mail: kbasharova@yandex.ru*

Мутации в гене *GBA1*, кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), являются фактором высокого риска болезни Паркинсона (БП), а биаллельные мутации в гене *GBA1* приводят к развитию болезни Гоше (БГ). Показано, что киназная активность обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2) регулирует активность GCase (Ysselstein D. et al., 2019).

Цель: оценка влияния ингибитора киназы LRRK2, MLI-2, на активность и уровень белка GCase, концентрацию гексозилсфингозина (HexSph) в первичной культуре макрофагов периферической крови (макрофаги) пациентов с GBA1-БП, БГ и контроля.

Активность GCase, концентрацию HexSph оценивали методом ВЭЖХ-МС/МС в макрофагах, культивируемых без и в присутствии MLI-2, 9 пациентов с GBA1-БП, 3 пациентов с БГ и 8 индивидуумов контрольной групп в трех повторах. Относительный уровень белка GCase оценивали вестерн-блотом.

Пациенты с GBA1-БП и БГ характеризовались снижением активности GCase и повышением концентрации HexSph по сравнению с контролем ($p < 0.05$). В макрофагах пациентов с БГ активность GCase была снижена, а концентрация HexSph повышена по сравнению с GBA1-БП ($p < 0.001$). В присутствии MLI-2 активность GCase повышалась в макрофагах пациентов с GBA1-БП ($p < 0.05$), но не изменялась в группе БГ ($p > 0.05$). В присутствии MLI-2 концентрация HexSph снижалась в макрофагах контроля ($p < 0.05$). MLI-2 не влиял на уровень белка GCase в группах ($p > 0.05$). Ингибирование киназной активности LRRK2 восстанавливает активность GCase в макрофагах пациентов с GBA1-БП, но не пациентов с БГ, которые характеризуются более низкой остаточной ферментативной активностью GCase.

Исследование поддержано грантом РФФ № 24-15-00177.

**НАРУШЕНИЕ МТОР-ЗАВИСИМОЙ АУТОФАГИИ
В МОНОНУКЛЕАРАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У
ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА,
АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ GBA1,
И БЕССИМПТОМНЫХ НОСИТЕЛЕЙ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ
GBA1**

**Безрукова А.И.^{1,2*}, Башарова К.С.¹, Милюхина И.В.^{1,3}, Пчелина
С.Н.^{1,2}, Усенко Т.С.^{1,2}**

*¹ Петербургский институт ядерной физики им.
Б.П.Константинова НИЦ «Курчатовский институт»,
Гатчина, Россия*

*² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский
университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург,
Россия*

*³ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-
Петербург, Россия
E-mail*: bz.nasty96@gmail.com*

Введение. Молекулярные механизмы развития нейродегенеративного заболевания болезни Паркинсона (БП),

ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (GBA1-БП), кодирующем лизосомный фермент β -глюкоцереброзидазу (GCase), неизвестны. Не все носители мутаций в гене *GBA1* в течение жизни заболевают БП (GBA1-носители). Ранее на основе анализа транскриптомных данных нами было показано нарушение mTOR-зависимой аутофагии, посредством которой деградирует ключевой белок в патогенезе БП альфа-синуклеин, в патогенезе GBA1-БП (Usenko et al., 2021; Usenko et al., 2023).

Цель заключалась в оценке изменения уровня белков, вовлеченных в mTOR-зависимую аутофагию, в патогенезе GBA1-БП в мононуклеарах периферической крови.

Материалы и методы. Относительные уровни фосфорилированной формы белка mTOR (Ser2448) (p-mTOR), белков LC3B, beclin-1, p62, cathepsin D были оценены методом вестерн блот в мононуклеарах периферической крови, полученных от пациентов с GBA1-БП, GBA1-носителей, пациентов со спорадической формой БП (сБП) и неврологически здоровых индивидуумов (контроль).

Результаты. Уровень зрелой формы cathepsin D снижен у пациентов с GBA1-БП, сБП и GBA1-носителей по сравнению с контролем ($p < 0.01$). Отношение LC3B-II/LC3B-I у пациентов со сБП снижено по сравнению со всеми исследуемыми группами ($p < 0.01$). Носители мутаций в гене *GBA1* независимо от статуса БП отличались повышенным уровнем белка beclin-1 по сравнению с пациентами со сБП и контролем ($p < 0.05$).

Заключение. Пациенты с GBA1-БП и GBA1-носители характеризуются выраженным изменением уровня белков cathepsin D и beclin-1, вовлеченных в аутофагию, на фоне увеличения белка альфа-синуклеина, показанного нами ранее (Emelyanov et al., 2021), в мононуклеарах периферической крови, что возможно обусловлено наличием мутаций в гене *GBA1* и не ассоциировано с развитием БП. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 24-25-00212).

ХРОНИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ КАК ОДИН ИЗ ФАКТОРОВ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ МОЗГА

Бондарь Н.И.^{1,2*}, Шпилюкова К.А.¹, Комлева Ю.К.¹

¹ Научный центр неврологии, Москва, Россия

² Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова Министерства

здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

E-mail*: niko13bondar@gmail.com

В связи с повышением среднего возраста населения регистрируется чрезмерное увеличение рисков развития возраст-ассоциированных заболеваний. Ряд недавних исследований подтвердил роль активации NLRP3 инфламмосомы в развитии болезни Альцгеймера и определил клеточную сенесценцию как решающий фактор. Одной из важнейших глобальных целей современных исследований является определение потенциальных генетических маркеров старения мозга для разработки систем ранней диагностики и комплексной терапии.

Весьма актуальным является проведение фундаментальных научных исследований, направленных на изучение роли воспаления при старении, а также возможностям использования определения активности инфламмосомы для диагностики тяжести когнитивных нарушений.

Цель исследования: изучение изменения экспрессии NLRP3 в головном мозге у стареющих мышей дикого типа, а также особенностей когнитивных функций у NLRP3 нокаутных мышей, не экспрессирующих инфламмосомы.

Основные результаты: В экспериментах с клеточными культурами мы проанализировали экспрессию NLRP3 и IL-18. Так, при анализе экспрессии IL-18 в клетках, полученных от старых животных WT, интенсивность флуоресценции IL-18 была значительно выше ($9,86 \pm 0,41$ а.е.) по сравнению с клетками, выделенными от взрослых мышей ($5,12 \pm 0,34$ а.е.) ($p < 0,0001$). Кроме того, значительные различия были обнаружены и в экспериментальных группах клеток, полученных от взрослых мышей разных генотипов: интенсивность

флуоресценции IL-18 была значительно выше в группе мышей WT по сравнению с группой животных КО ($p < 0,0001$). В клетках, полученных от пожилых мышей WT, интенсивность флуоресценции NLRP3 была значительно выше ($15,64 \pm 1,06$ а.е.) по сравнению с клетками, выделенными от взрослых животных ($5,92 \pm 0,32$ а.е.) ($p < 0,0001$). Увеличение количества мРНК целевых генов связано с наличием хронического воспаления, показателем сенесцентных клеток, а также постоянной активацией М1-микроглии, что приводит к развитию такого процесса как «инфламмэйджинг».

ПОДАВЛЕНИЕ АГРЕГАЦИИ БЕЛКА TDP-43 ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК NEAT1_1

Бурак М.В.^{1*}, Кухарская О.А.^{1,2}

¹ *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, Москва, Россия*

² *Институт физиологически активных веществ ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН,*

Черноголовка, Россия

E-mail: burakmarina23@mail.ru*

Белок TDP-43 (transactive response DNA binding protein 43 kDa) – повсеместно экспрессируемый ядерный ДНК/РНК-связывающий белок, играющий важную роль в метаболизме РНК. Избыточное накопление TDP-43 в цитоплазме приводит к нарушению его функций и образованию агрегатов. Данное явление наблюдается при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) и ряде других нейродегенеративных заболеваниях – группе расстройств нервной системы, в основе которых лежит гибель нейронов. Точные механизмы агрегации и способы защиты клеток от нее до сих пор не установлены. При БАС также наблюдается повышенный уровень длинной некодирующей РНК NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1), которая участвует в работе ЦНС, реализации ответа клетки на стресс и способна образовывать рибонуклеопротеиновые комплексы с TDP-43 и другими РНК-связывающими белками. Роль повышения NEAT1 при нейродегенерации пока не известна, а

специфическое взаимодействие NEAT1 с TDP-43 указывает на ее возможную роль в агрегации этого белка.

Целью исследования являлось определение влияния длинной некодирующей РНК NEAT1 на процесс агрегации белков в первичных нейрональных культурах в условиях индуцированной патологической белковой агрегации.

В качестве модели использовались первичные нейрональные культуры, полученные из гиппокампа мышей трансгенной линии NEAT1_1Tg, экспрессирующих короткую изоформу РНК NEAT1_1 человека, и контрольных мышей дикого типа C57Bl. Патологическая белковая агрегация была индуцирована путем трансфекции клеточных культур плазмидным вектором, кодирующим мутантную форму белка TDP-43 (d3-192) человека, слитым с флуоресцентным белком GFP для детекции агрегатов.

Анализ клеточных культур через 24 часа после трансфекции показал, что в них накапливались цитоплазматические агрегаты мутантного белка TDP-43, которые оказывали токсическое действие и приводили к гибели клеток. Агрегация белка TDP-43 (d3-192) была значимо снижена в клеточных трансгенных культурах, экспрессирующих NEAT1_1, по сравнению с культурами от животных дикого типа.

Таким образом, повышенный уровень длинной некодирующей РНК NEAT1_1 человека специфически подавляет агрегацию мутантного белка TDP-43.

ДИНАМИЧЕСКИЕ ТУБУЛИНОВЫЕ МИКРОТОТРУБОЧКИ ОПРЕДЕЛЯЮТ МОРФОЛОГИЮ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ СЕТИ СОМЫ ГИППОКОМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ

**Волкова Е.И.* , Раковская А.В., Беспрозванный И.Б.,
Пчицкая Е.И.**

*Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра
Великого, Санкт-Петербург, Россия
E-mail*: volkovakatusha04@gmail.com*

Одним из механизмов кальциевого сигналинга в нейроне является депо-управляемый вход кальция (ДУВК). ДУВК активируется при

снижении концентрации кальция в кальциевом депо – гладком эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Располагающийся на мембране ЭР белок-кальциевый сенсор STIM (stromal interacting molecule) при опустошении депо транслоцируется к клеточной мембране, где запускает вход кальция в нейрон. Было показано, что динамические тубулиновые микротрубочки, покрытые на положительном конце end-binding (EB) белками, участвуют в регуляции ДУВК. STIM1 широко экспрессируется в электронеозбудимых клетках и взаимодействует с белком EB1 (Rodríguez-García, R., et al., 2020). Гиперэкспрессия STIM1 стимулирует удлинение ЭР, происходящее посредством «tip attachment complex» (ТАС): трубочка ЭР удлиняется вместе с EB1-положительным концом растущей микротрубочки (Grigoriev, I., et al., 2008). Гомолог STIM2 широко экспрессируется в гиппокампаальных нейронах и взаимодействует с белком EB3. В соответствии с вышеизложенным, было предложено изучить влияние тубулиновых микротрубочек через взаимодействие белков STIM2-EB на морфологию ЭР в гиппокампаальных нейронах. Для изучения морфологии ЭР в соме нейронов первичной культуры гиппокампа мышей линии FVB на 7 день *in vitro* (DIV7) проводилась трансфекция с использованием плазмиды DsRed-ER и CFP-STIM2 или CFP-STIM2^{-IP/NN}, кодирующей вариант белка STIM2, не взаимодействующий с EB3. На DIV14 проводилась прижизненная визуализация структуры ЭР на конфокальном микроскопе. Анализ результатов продемонстрировал, что гиперэкспрессия STIM2 локально гомогенизирует структуру ЭР в сравнении с гиперэкспрессией STIM2^{-IP/NN}. Также гиперэкспрессия и STIM2, и STIM2^{-IP/NN} приводит к реорганизации ЭР в «ячеистые» структуры в сравнении с контрольной группой, причем STIM2 - в мелкие циклы трубочек, а STIM2^{-IP/NN} - в крупные, менее связанные сети трубочек. Работа поддержана грантом в рамках государственного задания FSEG-2024-0025.

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ДОФАМИНА НА
ДЕГРАНУЛЯЦИЮ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В МОЗГОВЫХ
ОБОЛОЧКАХ КРЫС ПРИ МИГРЕНИ**

**Гайфутдинова Н.Р.*, Петрова К.А., Шайдуллова К.С.,
Ситдикова Г.Ф.**

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань,
Россия*

E-mail: nazgulgaifutdinova@gmail.com*

Введение. У большинства пациентов с мигренью дофаминэргические симптомы сильно выражены (Barbanti et. al., 2020). Во время мигренозных атак наблюдается дегрануляция тучных клеток (Okragly et. al., 2018). Однако механизм вовлечения тучных клеток во время мигрени не ясен. Целью данной работы являлось изучение влияния дофамина на дегрануляцию тучных клеток в мозговых оболочках крыс.

Методика. Для моделирования мигрени крысам (Р 35-40) вводили нитроглицерин (НГ) (10 мг/кг) и через 2 часа, после проведения тестов на подтверждение развития мигрени, их забирали на эксперимент (острая модель мигрени). Другой группе животных НГ вводили до 9 дней и также проводили поведенческие тесты (хроническая модель мигрени). Исследование дегрануляции тучных клеток осуществлялось с помощью гистологического метода окрашивания твердой оболочки мозга крыс толуидиновым синим. Интактные черепа были помещены в раствор Кребса с дофамином (50 и 100 мкМ). После чего препараты помещались в параформальдегид, а затем промывались в фосфатно-солевом буферном растворе. Окрашивание проводилось толуидиновым синим. Съемка осуществлялась при 20х увеличении. Степень дегрануляции оценивали визуально, расчет велся в % от общего количества клеток.

Результаты. Compound 48/80 (10 мг/мл) вызывал массивную дегрануляцию тучных клеток до $89,21 \pm 2,53\%$ (n=4) и использовался в качестве положительного контроля. В контрольной группе количество дегранулированных тучных клеток составило $4,5 \pm 0,64\%$

(n=5). Инкубация в растворе, содержащем дофамин в концентрации 50 и 100 мкМ, не приводила к достоверному увеличению числа дегранулированных тучных клеток и составила $4 \pm 0,7\%$ (n=4) и $10,6 \pm 2,9\%$ (n=4) соответственно. В острой модели мигрени происходило достоверное увеличение числа дегранулированных тучных клеток до $22,2 \pm 4,5\%$ (n=6), а в хронической модели мигрени - составило $7,02 \pm 2,92\%$ (n=4). Было показано, что в острой модели мигрени происходит достоверное увеличение числа тучных клеток. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ №20-15-00100.

ВКЛАД КЛЕТОК НЕРВНОГО ГРЕБНЯ И ШВАННОВСКИХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В РАЗВИТИЕ РОГОВИЦЫ

Дроздова С.А.^{1,2*}, Дячук В.А.²

¹ *Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

² *Национальный Медицинский Исследовательский Центр им.
В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: sofya.sofya.drozdova@bk.ru*

Введение. Клетки нервного гребня (КНГ) являются популяцией эмбриональных мультипотентных клеток, участвующих в образовании множества органов позвоночных. Известно, что большинство клеток таких слоев роговицы, как строма и эндотелий происходят из клеток нервного гребня. Швановские клетки-предшественники (ШКП) представляют собой производные КНГ, и также обладают мультипотентностью. Доказано, что ШКП помимо шванновских клеток, дают начало меланоцитам, периферическим нейронам, нейроэндокринным и мезенхимальным клеткам.

Цель исследования. Определить вклад клеток нервного гребня и Шванновских клеток-предшественников в развитие роговицы.

Материалы и методы. В качестве модельных объектов использовали эмбрионы трансгенных мышей линии *Sox10^{CreERT2};R26R^{YFP}*. У данных мышей индуцибельная экспрессия Cre-рекомбиназы в клетках под *Sox10* промотором, приводит к накоплению в этих клетках YFP. Активацию тамоксифеном

производили на эмбриональных стадиях развития E8.5, E9.5, E10.5, E11.5. Анализ клеточного состава ткани проводили на криосрезе эмбрионов на стадии развития E17.5 с помощью метода непрямой иммуногистохимии. При иммуноокрашивании использовались следующие антитела: GFP, S100, MBR.

Результаты. Нами установлено, что КНГ и ШКП участвуют в образовании глии роговицы, представленной миелинизирующими и немиелинизирующими Шванновскими клетками. Показана колокализация GFP, глиального маркера S100 и специфического для мШК белка MBR, что указывает на участие клеток нервного гребня в образовании Шванновских клеток роговицы. При активации Cre-рекомбиназы с E10.5 и E11.5 также наблюдали колокализацию сигналов, что свидетельствует о дифференцировке ШКП, начинающих миграцию на E10 и E11, в глию роговицы.

Выводы. На основании полученных данных был сделан вывод, что КНГ а также ШКП, участвуют в эмбриональном развитии роговицы. Эти данные подтверждают свойство мультипотентности этих типов клеток. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшего понимания эмбриогенеза роговицы, что может послужить основой для разработки новых стратегий лечения различных патологий роговицы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2022-301).

ДЛИТЕЛЬНЫЕ ФЕБРИЛЬНЫЕ СУДОРОГИ ПРИВОДЯТ К СНИЖЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ГЛИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА СОЗРЕВАНИЕ МОЗГА КРЫС В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

Захарова М.В.* , Коваленко А.А., Зубарева О.Е., Зайцев А.В.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.

Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: zaharova-masha@yandex.ru*

Длительные фебрильные судороги (ФС) могут привести к необратимым изменениям в развивающемся мозге и считаются

потенциальным фактором риска развития нервно-психических нарушений и когнитивного дефицита. Астроцитарные и микроглиальные белки, участвующие в метаболизме глутамата, трофические факторы, про- и противовоспалительные цитокины, играют критически важную роль при созревании мозга. Однако изменение их экспрессии после ФС недостаточно изучено.

Целью исследования был анализ динамики изменений экспрессии генов астро- и микроглиальных белков в височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе крыс в норме и после ФС.

Для изучения изменений, происходящих с астро- и микроглией после ФС, была использована хорошо зарекомендовавшая себя модель, при которой судороги индуцируют потоком теплого воздуха (45-46 °C) у крысят самцов Wistar на P11. В экспериментальную группу включали животных, у которых развивались тонико-клонические судороги длительностью не менее 15 минут. В контрольные группы включали крысят из тех же пометов, которые на аналогичное время были отлучены от матери, но не нагревались, и интактных крысят. Исследование изменений экспрессии генов *Gfap*, *S100b* (маркеры астроцитов), *Aif1* (маркер микроглии), *Il1b* и *Il1rn* (про- и противовоспалительный цитокины), *Bdnf*, *Fgf2* и *Tgfb1* (трофические факторы), *Slc1a3* и *Slc1a2* (транспортёры глутамата), *Gjal* (коннексин Сх43) выполнено методом ОТ-ПЦР в реальном времени на P14, P21 и P50.

В ходе проведения исследования получены новые данные о возрастной динамике экспрессии изучаемых генов. Выявлено, что ФС не повлияли на экспрессию генов *Gfap*, *S100b*, *Aif1*, *Il1b* и *Il1rn*. Показано, что ФС приводят к снижению экспрессии генов *Bdnf*, *Fgf2*, *Tgfb1*, *Slc1a3*, *Slc1a2* и *Gjal* в височной коре на P14 и понижению экспрессии гена *Fgf2* в вентральной области гиппокампа на P14 и P21.

Таким образом, наиболее выраженные изменения экспрессии ряда генов астро- и микроглиальных белков после фебрильных судорог отмечались в височной области коры, что может негативно влиять на созревание мозга в раннем постнатальном онтогенезе.

Работа выполнена при финансовой поддержке грант РФФ № 23-25-00242.

**НЕЙРОМОДУЛЯТОРЫ ЧЕЛОВЕКА LYPD6A И LYPD6B
ПОДАВЛЯЮТ ХОЛИНЭРГИЧЕСКУЮ СИСТЕМУ
И КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ**

**Исаев А.Б.,^{1,2*}, Кульбацкий Д.С.², Бычков М.Л.², Андреев-
Андреевский А.А.³, Люкманова Е.Н.^{5,2,4*}**

¹ *Московский физико-технический институт, Долгопрудный,
Россия*

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

³ *Государственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

⁴ *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия*

⁵ *Шеньчжэньский МГУ-ППИ Университет, Шеньчжень, Китай
E-mail*: isaev.a@phystech.edu, lyukmanova_ekaterina@smbu.edu.cn*

Никотиновые рецепторы ацетилхолина (nAChR) регулируют многие нейрофизиологические функции, включая обучение и память. Их дисфункция связана с нейродегенеративными заболеваниями, включая болезнь Альцгеймера (Koukoulis et al., 2015). Высокогомологичные эндогенные белки человека Lypd6A и Lypd6B семейства Lyb6/uPAR локализованы на поверхности нейрональной мембраны посредством GPI-якоря и модулируют работу nAChR. Lypd6A важен для ювенильной синаптической пластичности и в период эмбриогенеза, положительно регулируя Wnt/ β -катенин сигнальный каскад (Vasilyeva et al., 2017).

В этой работе исследованы молекулярные, клеточные и поведенческие эффекты действия рекомбинантных водорастворимых аналогов белков ws-Lypd6A и ws-Lypd6B (функциональный LU-домен, без GPI-якоря). В ооцитах *Xenopus* показано ингибирование белком ws-Lypd6A рецепторов $\alpha 7$ - и $\alpha 3\beta 4$ -nAChR, для ws-Lypd6B – ингибирование $\alpha 7$ -, $\alpha 3\beta 2$ - и $\alpha 4\beta 2$ -nAChR. На переживающих срезах гиппокампа мыши показано ингибирование $\alpha 7$ -nAChR и снижение долговременной потенциации (LTP) при инкубации срезов с ws-Lypd6A; ws-Lypd6B не влияет на LTP, но усиливает кратковременную пресинаптическую

пластичность (PPF). Инкубация первичных нейронов гиппокампа с ws-Lyrd6A и ws-Lyrd6B снижает число дендритных шипиков. Введение препаратов ws-Lyrd6A и ws-Lyrd6B в желудочки мозга мыши в течение 15-21 дней оказывает контекстно-зависимое тревожное действие и ухудшает обучение в тесте на распознавание нового объекта, без влияния на моторную память и без изменений в ЛТР.

Новые данные о функции Lyrd6A и Lyrd6B, состоящие в негативной модуляции холинергической системы на молекулярном, морфологическом и когнитивном уровне подчеркивают важную физиологическую роль этих белков.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ №24-14-00419.

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ СТАРЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПРЯМОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ

**Кашеев Р.Р.*, Сахенберг Е.С., Михайлова Н.А.,
Красковская Н.А.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: mar.casheevs@gmail.com*

Моделирование возрастных изменений в головном мозге человека является одной из самых сложных задач современной нейробиологии и нейромедицины. Прямое репрограммирование является наиболее перспективным способом получения индуцированных нейронов человека для изучения возрастных изменений при старении за счет сохранения эпигенетических меток в клетках. Для разработки новой клеточной модели старения нейронов человека *in vitro* при помощи прямого репрограммирования, основанного на применении микроРНК-9-124 и транскрипционных факторов MYT1L и NeuroD2 были получены индуцированные кортикальные нейроны из 3 линий фибробластов от доноров молодого возраста и 3 линий фибробластов пожилого возраста. В индуцированных нейронах, полученных из фибробластов пожилых доноров наблюдается повышенный уровень

окислительного повреждения ДНК, детектируемый антителами к 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозину, повышенную экспрессию белка p21, и снижения ламина В1, наблюдаемого при старении. Таким образом, разрабатываемая клеточная модель воспроизводит характерный для старения нейронов фенотип и может быть использована для оценки нейро- и геропротекторных препаратов на доклинических этапах исследований.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063.

АНАЛЬГЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПЕПТИДА КУНИТЦ-ТИПА МОРСКОЙ АНЕМОНЫ HETERACTIS MAGNIFICA

**Кветкина А.Н.^{1*}, Климович А.А.¹, Кульбацкий Д.С.²,
Люкманова Е.Н.^{2,3,4}, Шенкарев З.О.^{2,3}, Лейченко Е.В.¹**

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии имени
Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

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

³ Московский государственный университет им. М.В.
Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Шеньчженьский МГУ-ППИ Университет, Шеньчжень, Китай
E-mail*: kvetkinaan@gmail.com

Пептиды Кунитц-типа широко представлены во всех живых организмах, включая ядовитых животных. Их пространственная структура имеет компактный фолд, стабилизированный тремя дисульфидными связями. Пептиды Кунитц-типа могут взаимодействовать с различными мишенями (сериновые протеазы, Kv, TRPV1, Cav, V2R, P2X7R) и проявляют различную биологическую активность.

В данной работе была изучена анальгетическая активность пептида Кунитц-типа морской анемоны *Heteractis magnifica*, HClQ2c1, в *in vivo* тестах капсаицин- и АИТС-индуцированной боли. Пептид в дозах до 10 мг/кг не оказывал нейротропного и нейротоксического действия и не влиял на психоэмоциональное состояние мышей. В

тесте «горячая пластина» пептид в дозе 0,1 мг/кг достоверно увеличивал латентное время реакции на термостимуляцию, тогда как в тестах капсаицин- и АИТС-индуцированной боли НСИQ2с1 в той же дозе достоверно снижал время поджатия лапы мыши в 4 и 3 раза, время облизывания лапы в 1,5 раза и количество облизываний в 2 и 1,5 раза, соответственно. Более того, в течение 24 часов после введения пептида в дозе 0,1 мг/кг наблюдалось торможение роста отека лапы, вызванное АИТС, практически до первоначального состояния, что указывает на противовоспалительный эффект пептида. Анальгетическая активность НСИQ2с1, вероятно, связана с действием пептида на болевой канал TRPA1. Показано, что НСИQ2с1 усиливает входящие и выходящие токи через канал TRPA1 крысы, вызванные АИТС или диклофенаком, что указывает на потенцирование канала. Вероятно, НСИQ2с1 индуцирует десенсibilизацию нейронов, экспрессирующих TRPA1, что, в свою очередь, вызывает значительное снижение ноцицептивных и воспалительных реакций. Таким образом, пептид Кунитц-типа морской анемоны *H. magnifica* в дозе 0,1 мг/кг проявляет достоверную анальгетическую активность, опосредованную потенцированием болевого канала TRPA1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00326).

ВЛИЯНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДУЛЯТОРОВ НА ДОЛГОВРЕМЕННУЮ ПОТЕНЦИАЦИЮ У ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

Колотова Д.Е.*, Малышев А.Ю., Балабан П.М., Зюзина А.Б.

Институт Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии

РАН, Москва, Россия

E-mail: kolotova@ihna.ru*

Эпигенетические модификации, такие как ацетилирование гистонов и метилирование ДНК, играют важную роль в регуляции долговременной синаптической пластичности. Для исследования механизмов эпигенетической регуляции применяют эпигенетические

модуляторы – ингибиторы гистондеацетилаз и ингибиторы ДНК-метилтрансфераз (ДНМТ). В данной работе исследовалось влияние ингибиторов гистондеацетилаз бутирата натрия (БН) и трихостатина А (ТСА), а также ингибитора ДНМТ RG108, на долговременную синаптическую пластичность у виноградной улитки.

Работа была проведена на изолированной ЦНС виноградных улиток *Helix Lucorum*. С помощью острых стеклянных микроэлектродов осуществляли регистрацию активности премоторных (командных) интернейронов (Pa3 и Pa2) париетальных ганглиев. Регистрировали возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП), вызванные электрической стимуляцией второго кожного или интестинального нервов (каждые 10 минут на протяжении записи). Длительность регистрации составляла 5 часов. Для исследования долговременной пластичности применяли протокол гомосинаптической потенциации. В рамках протокола осуществляли 5-кратную тетанизацию интестинального или второго кожного нерва с интервалом в 5 минут. Перед каждой тетанизацией добавляли в экспериментальную ванночку серотонин; через 2 минуты после добавления серотонин отмывали. В зависимости от схемы эксперимента за 40-50 минут до первой тетанизации в экспериментальную ванночку добавляли БН, RG108, RG108+БН, RG108+ТСА, после чего проводили “отмыв” препаратов.

Было показано, что БН вызывает увеличение амплитуды ВПСП при тетанизирующей стимуляции по интестинальному нерву. Аппликация RG108 вызывала значимое снижение амплитуды ВПСП во время поздней фазы долговременной потенциации. При совместном введении RG108+БН или RG108+ТСА было показано усиление поздней фазы долговременной потенциации.

В нашей работе было продемонстрировано, что аппликация ингибитора гистондеацетилаз БН приводила к усилению долговременной синаптической пластичности, в то время как аппликация ингибитора ДНМТ RG108 приводила к снижению долговременной пластичности. Также было показано, что аппликация ингибиторов гистондеацетилаз БН и ТСА способна компенсировать негативное влияние ингибитора ДНМТ.

**ИНФИЦИРОВАНИЕ ВИРУСОМ ГРИППА В ПЕРВЫЙ
ТРИМЕСТР БЕРЕМЕННОСТИ ВЫЗЫВАЕТ ИЗМЕНЕНИЯ В
ГИППОКАМПАЛЬНЫХ СТРУКТУРАХ МОЗГА
НОВОРОЖДЕННЫХ МЫШЕЙ**

**Коровина О.А. *, Раковская А.В., Пчицкая Е.И.,
Беспрозванный И.Б.**

Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра

Великого, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: olesia20201kr@gmail.com*

Респираторные вирусные заболевания могут вызывать нейродегенеративные заболевания (Kristin S Levine et al., 2023). Воспаление может повлиять и на процесс дифференцировки клеток. Одной из областей мозга, отвечающих за нейрогенез, является зубчатая извилина (DG) (Guo-li Ming et al., 2011). В гиппокампе в зонах CA1 и CA3 время пика нейрогенеза приходится на эмбриональный период, а астрогенеза - на первые дни рождения. Однако в DG эти два процесса протекают параллельно во время раннего постнатального развития (Allison M Bond et al., 2020). Процесс образования новых нейронов напрямую связан с белком SOX2, который высоко экспрессируется в пролиферирующих нейрональных клетках-предшественниках и подавляется при дифференцировке в постмитотические нейрональные и глиальные клетки (Shuchen Zhang et al., 2014).

В связи с этим было рассмотрено влияние вируса гриппа California на нейрогенез плода в CA1, CA3 и DG. Исследование было проведено с экспериментальной группой, имеющей эффект заражения вирусом, и контрольной. Для изучения нейрогенеза применялся метод иммуногистохимии с использованием антител к MAP2, GFAP, SOX2 и красителя Hoechst. После окрашивания срезов была получена серия конфокальных изображений. Чтобы сравнить экспрессию клеточных маркеров между группами мышей, были проанализированы некоторые параметры для соответствующих меченых белков.

В результате полученных данных было показано, что в CA1 и CA3 количество нейрональных клеток не изменилось. Однако было обнаружено, что в DG у контрольной группы толщина нейронального слоя больше, следовательно, у экспериментальной было статистически значимо меньше нейронов. Это говорит о возможных последствиях респираторных заболеваний, влияющих на мозг, в частности на нейрогенез. В продолжение исследований будет проанализировано влияние вируса гриппа на астроглию (GFAP) и нейрональные клетки-предшественники (SOX2). Работа поддержана грантом в рамках государственного задания FSEG-2023-0014 (Безпрозванный И. Б.).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛГОРИТМА CELLPOSE ДЛЯ ОЦЕНКИ ПАРАМЕТРОВ МИКРОГЛИИ

**Костюнина О.В.^{1*}, Комольцев И.Г.^{1,2}, Манолова А.О.¹,
Широбокова Н.И.¹, Шальнева Д.В.¹, Кострюков П.А.¹,
Новикова М.Р.¹, Гуляева Н.В.^{1,2}**

*¹ Институт Высшей нервной деятельности и
нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

*² Научно-практический психоневрологический центр им. З.П.
Соловьева, Москва, Россия*

E-mail: okostyunina67@mail.ru*

Введение. Микроглия — один из ключевых регуляторов нейровоспаления, сопровождающего многие заболеваний мозга. Функциональное состояние микроглии тесно связано с морфологией клетки (площадью, числом отростков). Цель нашего исследования — выбрать наилучший метод обработки микрофотографий микроглии путем сравнения обработки вручную и с использованием обученной модели для оптимизации оценки степени нейровоспаления.

Материалы и методы. Были использованы микрофотографии микроглии крыс линии Wistar (маркер Iba1): обучающая выборка (n=588 клеток) и крысы с черепно-мозговой травмой (ЧМТ, n=2127 клеток). Обработка изображений проводилась вручную (программа

ImageJ) и с использованием Cellpose – алгоритма сегментации микрофотографий на основе нейронных сетей (глубокого машинного обучения). Обучение модели производилось на основе предтренированных моделей LiveCell 1 (LC1) и Cellpose (CP) с двумя вариантами порога распознавания (ПР) клеток – 0,4 (стандарт) и 1.

Результаты. Лучшие результаты показала модель на основе CP (ПР=1): число нераспознанных клеток было наименьшим (0,68%), а соотношение площади клетки, распознанной алгоритмом и площади клетки, распознанной вручную – наибольшим; при этом доля ложноотрицательно распознанной площади клетки не превышала те же показатели у других моделей (47%). Однако доля ложноположительно распознанной площади клеток была выше (14%). Модель показала наилучшую корреляцию площадей и периметров клеток, обработанных с помощью алгоритма, с теми же параметрами клеток, обработанных вручную ($r=0.705$, $p<0.00001$ и $r=0.66$, $p<0.00001$, соответственно). Также с помощью этой модели была выявлена активация микроглии на микрофотографиях крыс группы ЧМТ.

Заключение. Алгоритм Cellpose может быть использован для обработки микрофотографий микроглии и оценки параметров клеток; лучше всего для этого подходит модель на основе CP. Качество распознавания морфологии клеток достаточно для оценки функционального состояния микроглии.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОГЛИИ В ПОЛОСАТОМ ТЕЛЕ И ЧЕРНОМ ВЕЩЕСТВЕ У КРЫС ЛИНИИ SHR

Куликова П.В.* , Гусельникова В.В.

*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург,
Россия*

E-mail: pkulikova915@gmail.com*

Микроглия представляет собой особую популяцию «иммунных» клеток центральной нервной системы, выполняющих широкий

спектр функций в норме и при патологии. Нейровоспаление, инициированное микроглией, вносит вклад в патогенез болезни Паркинсона — распространенного нейродегенеративного заболевания, которое характеризуется повреждением и гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции (*Substantia Nigra, SN*) и нарушением коммуникации этих нейронов с нейронами полосатого тела (*Striatum, Str*). Учитывая тот факт, что одним из факторов риска при развитии болезни Паркинсона может выступать артериальная гипертензия, важным представляется оценить функциональное состояние микроглии в *SN* и *Str* на фоне хронического повышения артериального давления. Целью работы было изучение морфофункционального состояния микроглии в *SN* и *Str* у крыс линии SHR. В качестве материала для исследования были использованы образцы головного мозга крыс-самцов линии SHR (возраст 8-9 месяцев, n=8), которая является широко используемой моделью хронической артериальной гипертензии. Микроглию выявляли при помощи постановки иммуногистохимической реакции на кальций-связывающий белок Iba1. В результате Iba1-иммунопозитивные клетки были обнаружены на всех исследованных срезах. Было отмечено наличие морфологических различий между микроглией в *SN* и в *Str*. Микроглия в *Str* была распределена равномерно и не демонстрировала признаков активации. Клетки микроглии в этой области мозга имели тонкие и сильно ветвящиеся отростки, длина которых в несколько раз превышала линейный размер тела клетки. В области *SN* плотность микроглии была визуальнее выше по сравнению с таковой в *Str*. Клетки микроглии в *SN* имели признаки активации, среди которых укорочение и утолщение отростков, увеличение размеров тела клеток и усиление интенсивности реакции на Iba1. Таким образом, в условиях хронического повышения артериального давления происходит активация микроглии в *SN*, что может указывать на развитие нейровоспаления в этой области мозга. Исследования выполнены за счет средств государственного задания ФГБНУ «ИЭМ» (FGWG-2022-0002).

**ИЗМЕНЕНИЯ СВОЙСТВ СПОНТАННЫХ
ВОЗБУЖДАЮЩИХ ГЛУТАМАТНЫХ
ПОСТСИНАПТИЧЕСКИХ ТОКОВ НЕЙРОНОВ
ГИППОКАМПА КРЫС В УСЛОВИЯХ
ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ**

Курмашова Е.Д.

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань,
Россия*

E-mail: kurmashovaed@gmail.com

Повышенный уровень гомоцистеина (ГЦ) у беременных связан с риском осложнений беременности и развитии плода. ГЦ усиливает активность глутаматных рецепторов, что приводит к развитию нейродегенеративных заболеваний.

Целью данного исследования было изучение изменений спонтанных постсинаптических токов, опосредованных активацией NMDA- и AMPA-рецепторов нейронов гиппокампа новорождённых крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией (ГГЦ).

В качестве модели пренатальной ГГЦ использовался метод «метиониновой нагрузки». Эксперименты проводились на горизонтальных срезах гиппокампа (400мкм) в первую постнатальную неделю крыс. Токи глутаматных рецепторов регистрировались методом patch-clamp, удерживая потенциал +40мВ в присутствии блокаторов AMPA- и ГАМК(A)-рецепторов, для регистрации токов, опосредованных активацией NMDA-рецепторов и на потенциале -70мВ в присутствии блокаторов NMDA- и ГАМК(A)-рецепторов для регистрации AMPA-токов. Определяли амплитуду, время спада и частота спонтанных NMDA- и AMPA-токов.

В контроле амплитуда спонтанных NMDA-токов составляла 24.8 ± 0.6 пА (n=20), время спада -75.8 ± 13 мс и частота -0.19 ± 0.06 Гц (n=20). Анализ спонтанных NMDA-токов нейронов в условиях пренатальной ГГЦ показал, что амплитуда и время спада токов было достоверно меньше, чем в контроле. Амплитуда спонтанных NMDA-токов составила 14.5 ± 0.3 пА (n=22; p<0.05), а время спада -54.5 ± 5 мс (n=22; p<0.05). Анализ распределения амплитуд

спонтанных NMDA-токов показал снижение количества высокоамплитудных событий в условиях пренатальной ГЦ. Однако, частота спонтанных NMDA-токов была выше по сравнению с контролем и составила 0.8 ± 0.05 Гц ($n=22; p < 0.05$).

В контроле амплитуда спонтанных AMPA-токов составляла 16.5 ± 1.2 пА ($n=16$), время спада -17.5 ± 1.5 мс и частота -0.06 ± 0.01 Гц ($n=16$). В условиях пренатальной ГЦ амплитудно-временные параметры и частота спонтанных AMPA-токов были выше. Амплитуда спонтанных AMPA-ответов составила 26.2 ± 5.5 пА ($n=20; p < 0.05$), время спада -25.9 ± 9.1 мс, а частота -0.3 ± 0.1 Гц ($n=20; p < 0.05$). Таким образом, в условиях хронического действия высоких концентраций ГЦ в пре- и постнатальный период происходят изменения амплитудно-временных параметров и частоты спонтанных постсинаптических токов, опосредованных активаций NMDA- и AMPA-рецепторов.

МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧНОСТИ ЭКЗОГЕННЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ

**Лазарев В.Ф.^{1*}, Заерко А.В.², Сахаров А.А.¹, Гужова И.В.¹,
Маргулис Б.А.¹**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*² Гродненский государственный медицинский университет,
Гродно, Беларусь*

E-mail: lazarev@incras.ru*

В современной науке все больше внимания уделяется влиянию микроокружения, то есть внешней среды на омываемые им клетки. Это может быть микроокружение, это могут быть жидкие среды организма, такие как кровь или спинномозговая жидкость (СМЖ). Различные группы фокусируются на разных компонентах такого окружения. Подобными факторами могут быть как очевидно токсичные - такие как активные формы кислорода, а могут быть микроРНК или более сложные структуры, например, экзосомы. Еще одним из компонентов клеточного окружения, который может

оказывать ощутимое влияние на их функционирование, являются белки и их комплексы. К настоящему моменту накоплен значительный объем экспериментальных данных о том, какие белковые комплексы имеют значение с точки зрения инициации и распространения нейродегенеративных процессов, вызванных нейродегенеративными заболеваниями, а также черепно-мозговыми травмами и ишемическими инсультами.

В настоящей работе мы продемонстрировали токсическое действие белковых агрегатов, содержащих глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, локализованных в спинномозговой жидкости пациентов с такими патологическими состояниями, как инсульт и болезнь Альцгеймера. Важным результатом наших исследований стали данные о возможных механизмах цитотоксического действия таких агрегатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-74-10117).

**СОЗДАНИЕ ЛЕНТИВИРУСНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ
ПОЛУЧЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ
ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ МЕТОДОМ
ПРЯМОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ**

Малыгина А. В.*, Михайлова Н. А., Красковская Н. А.

Институт цитологии Российской Академии наук, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: arina180902@mail.ru*

Болезнь Паркинсона (БП) в настоящее время является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием, поражающим около 10 миллионов пожилых людей во всем мире. БП характеризуется дегенерацией дофаминергических нейронов черной субстанции среднего мозга. Несмотря на высокую распространенность, БП все еще является неизлечимой. Не существует эффективных инструментов для предотвращения возникновения БП, выявления заболевания на ранних стадиях или точной оценки риска прогрессирования заболевания. Следовательно,

существует растущий спрос на пациент-специфические модели БП ввиду гетерогенности и возраст-ассоциированности данной нейропатологии. Метод прямого репрограммирования позволяет получить модель нейронов, сохраняя возрастные изменения клеток. Молекулярной основой прямого репрограммирования являются специфичные для линии транскрипционные факторы являются. В ходе анализа литературных данных, было выяснено, что *Nurr1* играет решающую роль в развитии и созревании дофаминергических нейронов среднего мозга.

В представленной работе мы получили лентивирусную конструкцию, содержащую ген *Nurr1*, которую затем использовали для дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в индуцированные дофаминергические нейроны методом прямого репрограммирования. Полученные клетки окрашивались на маркерный белок дофаминергических нейронов – тирозингидроксилазу. Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063

**КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ И ОСОБЕННОСТИ
СОЦИАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ МЫШЕЙ,
МОДЕЛИРУЮЩИХ НАСЛЕДСТВЕННОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ,
СВЯЗАННОЕ С ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ МОЗЖЕЧКА, БОЛЕЗНЬ
ХАНТИНГТОНА**

Маринина К.С.^{1,2*}, Безпрозванный И.Б.^{1,2,3}, Егорова П.А.¹

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

² *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Юго-западный медицинский центр университета Техаса, Даллас, США*

E-mail: ks.marinina@bk.ru*

Болезнь Хантингтона (БХ), редкое наследственное нейродегенеративное заболевание, при котором, в основном,

дегенерации подвержен стриатум, но уже давно известно, что атрофия мозжечка наблюдается и при БХ и происходит на ранних стадиях заболевания независимо от стриатума (Vonsattel et al, 1998). БХ характеризуется нарушением двигательных функций - хореей, а также психическими нарушениями, связанными с прогрессирующей деменцией (Wolf et al, 2015). Однако по-прежнему остается неясным участие мозжечка в формировании когнитивных и аффективных симптомов при БХ.

Ранее в нашей лаборатории уже были исследованы электрофизиологические особенности нарушений работы клеток Пуркинье мозжечка, с использованием метода внеклеточной записи *in vivo*, у трансгенных мышей моделирующих БХ, YAC128 (Egorova et al, 2020). В нынешнем исследовании мы провели масштабную батарею поведенческих тестов с акцентом на поиск не только когнитивных и аффективных симптомов, но также и нарушений социального поведения животных с БХ. Так, мыши YAC128 демонстрировали бестревожное поведение, дефицит памяти распознавания и сниженный интерес к социальным взаимодействиям. Некоторые особенности социального поведения были обнаружены у мышей с БХ по результатам теста на характер социального взаимодействия с незнакомой мышью. Отмечается снижения доминантного поведения. Данное исследование позволяет нам лучше характеризовать поведенческих фенотип мышью БХ и в дальнейшем эффективнее подобрать способы терапии направленной, в том числе и на мозжечковые симптомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 075-15-2024-548).

**АГОНИСТ TRPC6 КАНАЛА ПРОЯВЛЯЕТ
СИНАПТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА В *IN VITRO*
МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

Мелентьева Д.М.¹, Зернов Н.И.¹, Камарян В.С.², Макичян А.Т.²,
Унанян Л.С.², Попугаева Е. А.^{1*}

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

² Российско-Армянский университет, Ереван, Армения

E-mail*: lena.popugaeva@gmail.com

Поиск терапевтических агентов для лечения болезни Альцгеймера (БА) - актуальная задача в современном мире. Применение препаратов, действие которых основано на амилоидной гипотезе БА, дают противоречивые результаты. На основании кальциевой теории БА, в качестве терапевтической мишени был выбран TRPC6 канал плазматической мембраны нейронов.

Ранее было продемонстрировано, что активация TRPC6 имеет нейропротекторный эффект. Были показаны синаптопротекторные свойства соединения 51164 на мышцах линии 5xFAD (Popugaeva et al., 2019). Однако 51164 показал неудовлетворительные результаты фармакокинетики.

Был определён фармакофор 51164, использованный для поиска структурно-сходных соединений: агонистов TRPC6 с синаптопротекторными свойствами. Из баз данных ChEMBL и Zinc были выбраны 858 схожих структур, из них 14 отвечают критериям схожести с лекарственными соединениями (по параметрам ADMET). Стабильность связывания для пяти соединений показана экспериментами по молекулярной динамике.

Далее были исследованы нейропротекторные свойства одного из данных соединений (cmp2). Способность cmp2 активировать TRPC6 была показана *in vitro* в эксперименте по кальциевой визуализации на клетках НЕК293Т. На первичной гиппокампальной культуре добавление 100 нМ cmp2 восстанавливало структуру грибовидных шипиков. В ходе фармакокинетического исследования в *in vivo* условиях соединение обнаруживается в крови мыши в течение часа;

способно проникать через гематоэнцефалический барьер, детектируется в головном мозге в течение 2 часов. Также на срезах мозга 8-месячных мышей линии 5xFAD показано, что *str2* способен восстанавливать сигнал долговременной потенциации при введении внутривентрикулярно в дозе 10 мг/кг в течение 14 дней.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках гос. задания по теме: «Реализации комплекса мер по повышению эффективности деятельности Российско-Армянского (Славянского) университета» (определение фармакофора 51164), а также при частичной финансовой поддержке гранта РНФ20-75-10026 (*in vitro* и *ex vivo* эксперименты).

ПОИСК ЛИГАНДОВ РЕЦЕПТОРА, АССОЦИИРОВАННОГО СО СЛЕДОВЫМИ АМИНАМИ, 9-ГО ПОДТИПА (TAAR9)

Муртазина Р.З. *, Гайнетдинов Р.Р.

*Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский
государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: ramilya.murtazina@gmail.com*

Семейство рецепторов, связанных со следовыми аминами (TAAR), принадлежит к рецепторам, сопряженным с G-белком. У человека есть 6 функциональных генов этого семейства. Наиболее известный член этого семейства, TAAR1, на данный момент является потенциальной мишенью для лечения шизофрении. Считается, что все остальные TAAR функционируют как новый класс обонятельных рецепторов. Однако, есть доказательства того, что они также могут играть роль в центральной нервной системе и на периферии. Важной задачей, решение которой позволит раскрыть функцию рецептора, является поиск его лигандов. В данной работе была поставлена задача разработать методику для поиска лигандов TAAR9, а также провести сам скрининг среди соединений различной природы.

Для экспрессии TAAR9 в клетках HEK293T под контролем промотора CMV была получена плаزمиды pcDNA-bN9-rTAAR9. В целях повышения уровня мембранной экспрессии был добавлен N-концевой таг, состоящий из первых 9 аминокислот бета-2-адренергического

рецептора (MCQPGNGSA). Активацию рецептора исследовали на основе принципа BRET. Клетки контрансфецировали экспрессионным вектором рсDNA3.1(+)_{EPAC}, который обеспечивал конститутивную экспрессию гибридного гена Rluc-EPAC-YFP, продукт которого является биосенсором мониторинга активации Gas-сигнального пути. В его основе лежит цАМФ-зависимый фактор EPAC1 (Exchange protein activated by cAMP 1), изменяющий свою конформацию в ответ на связывание цАМФ.

В ряде работ отмечено, что рецепторы семейства TAAR практически не локализируются на цитоплазматической мембране при экспрессии в НЕК293Т. Добавление N-концевого тага позволило улучшить плазматическую экспрессию TAAR9 и получить специфический ответ на известный ранее агонист TAAR9 N-метилпиперидин. Было протестировано >400 соединений, и найден ряд активных соединений с EC₅₀ в микромолярном диапазоне: 1,2-аминоэтипиперидин, триэтиламин, полиамины спермин, спермидин и диамин кадаверин. Результаты работы позволяют продолжать поиск лигандов, а также исследовать функцию TAAR9 *in vivo* на имеющихся в нашей лаборатории животных, нокаутных по этому гену.

Работа выполнена при финансовой поддержке СПбГУ (шифр проекта 95444211). Исследования проведены с использованием оборудования РЦ РМиКТ СПбГУ.

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ В МОЗГ МЫШЕЙ ПАТОГЕННЫХ АГРЕГАТОВ ТАУ БЕЛКА НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СКЛОННОГО К АГРЕГАЦИИ БЕЛКА TDP-43

Наздрачева М.Р.^{1*}, Кухарский М.С.^{1,2}

¹ *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

² *Институт физиологически активных веществ ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Россия*

E-mail: nazdracheva2001@mail.ru*

Тау-белок - белок, ассоциированный с микротрубочками, который выполняет функцию стимуляции сборки тубулина, что позволяет

поддерживать стабильность структуры аксональной и клеточной морфологии. Гиперфосфорилирование и агрегация Тау являются основными патологическими явлениями при болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваниях (НДЗ). Совместное участие нескольких типов белков, склонных к агрегации, в образовании патогистологических включений при тауопатиях часто наблюдается в аутопсийном материале, что позволяет предположить их взаимодействие друг с другом. В экспериментах убедительно показана способность патологических форм Тау индуцировать («seeding» - с англ. засев) и усиливать агрегацию нативных форм этого же белка, но влияние на другие белки склонные к агрегации изучено в меньшей степени.

Целью данного исследования являлось изучение влияния стереотаксического введения в головной мозг мышей агрегатов Тау на количество и распределение белков TDP-43 и FUS, связанных с НДЗ. Из мозга трансгенных мышей линии TauP301S и от мышей дикого типа линии C57BL были получены осветленные гомогенаты мозга. Они вводились с помощью стереотаксической инъекции в область амигдалы мышам дикого типа. Через 50 дней после инъекции забирали материал для гистологического анализа. Далее проводили иммуногистохимическое окрашивание на маркеры: Iba1, белок MART, белок FUS, белок TDP-43. Анализ изображений проводился в программе ImageJ.

Анализ маркеров астроцитов и микроглиоцитов показал, что выраженной нейровоспалительной реакции после инъекции гомогенатов, содержащих агрегаты Тау, не наблюдается. Количество и распределение белков FUS и MART не отличались в опытной и контрольной группах. Было выявлено значимое снижение количества TDP-43 у мышей после инъекций агрегатов Тау и было обнаружено аномальное ядерно-цитоплазматическое перераспределение TDP-43 у мышей опытной группы.

Введение в головной мозг мыши экзогенного мутантного Тау влияет на количество и распределение TDP-43 в клетках в зоне инъекции, что может свидетельствовать о влиянии Тау на метаболизм или свойства TDP-43.

НЕЙРОПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРБОНАТА ЛИТИЯ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МЕЛАНОМЫ

Обанина Н.А.^{1,2*}, Бгатова Н.П.²

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский центр клинической и
экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН,
Новосибирск, Россия

E-mail*: n.obanina@g.nsu.ru

Литий является принятым препаратом для лечения нейродегенеративных расстройств. Протекторное действие лития связано с его встраиванием в сигнальные пути клеточного выживания и апоптоза. Известно, что опухолевые клетки продуцируют цитокины, которые могут повреждать гематоэнцефалический барьер и, как следствие, нарушать функции нейронов.

Цель – оценить влияние периферической опухоли и применения карбоната лития на структурную организацию пирамидных нейронов префронтальной коры экспериментальных животных.

Материалы и методы. Мышей-самцов C57BL/6 делили на 3 группы (n=5): Контроль, Опухоль и Опухоль+Li. Клетки Меланомы B16 вводили подкожно в правую паховую складку в дозе 1.0×10^6 . Карбонат лития вводили *per os* 300 мг/кг ежедневно 7 дней, затем проводили забор фрагментов префронтальной коры. Фотографии получали в электронном микроскопе JEM1400. Подсчитывали объемные плотности органелл в цитоплазме пирамидных нейронов (30 нейронов/группа). Достоверность различий определяли в программе Statistica 10 с использованием U-критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Результаты. В группе с опухолью наблюдали повышение экспрессии G-CSF и GM-CSF, снижение экспрессии BDNF. Отмечали увеличение объемной плотности митохондрий с деструкцией крист и ЭПР с расширениями цистерн в группе с опухолью. Также выявили изменение соотношения аутофагальных структур. В группе «Опухоль» преобладали аутофагосомы, тогда как в контроле – лизосомы. В группе с литием отмечали увеличение экспрессии IL-4, IL-6, IL-12 и BDNF. Ультраструктурная организация нейронов не отличалась от нейронов в контрольной группе.

Заключение. В условиях моделирования меланомы в пирамидных нейронах развиваются структурные изменения, которые могут приводить к нарушению функции клеток: отмечаются признаки окислительного стресса, стресса ЭПР. Снижение экспрессии BDNF может обусловить уменьшение синаптической пластичности. Карбонат лития способствовал сохранению структурной организации нейронов у животных с опухолью, что свидетельствует о его нейропротективном действии в условия опухолевого роста. Работа выполнена в рамках государственного задания Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ИЦиГ СО РАН (№ NFWNR-2022-0012).

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР
ИНДУЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ СТРИАТУМА
ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ
ХАНТИНГТОНА**

Парфенова П.С.*, Михайлова Н.А., Красковская Н.А.

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: sucrederaisin@gmail.com*

Болезнь Хантингтона (БХ) представляет собой аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание. При развитии патологии в первую очередь поражаются ГАМК-ергические средние шипиковые нейроны (СШН) стриатума, в связи с чем болезнь сопровождается нарушениями локомоции, когнитивными и психическими отклонениями. Экспансия CAG триплетов в 1 экзоне *Htt* выше порога в 36 повторов приводит к развитию фенотипа БХ. На клеточном уровне БХ сопровождается накоплением агрегатов мутантного НТТ, обеднением дендритного дерева нейронов, метаболическими и структурными нарушениями, среди которых, в том числе, деструкция митохондрия-ассоциированных участков мембраны (МАМ) эндоплазматического ретикулума и снижение мембранного потенциала митохондрий.

Широко распространенной моделью исследования БХ является животная модель. Однако, в связи со специфичностью БХ, встречающейся только у человека, в последние годы появилась

тенденция исследования данного заболевания также и на клетках человека. К пациент-специфическим моделям можно отнести модель прямого репрограммирования, которая позволяет дифференцировать соматические клетки напрямую в нейроны стриатума и при этом сохранить возраст-ассоциированных фенотип клеток пациентов.

В данной работе использованы дермальные фибробласты, полученные от здоровых доноров и пациентов с подтвержденным диагнозом БХ с разным количеством глутаминовых повторов. Клеточные линии были репрограммированы в СШН по модифицированному протоколу трансдифференцировки (Kraskovskaya et al., 2023). В индуцированных СШН продемонстрированы накопление агрегатов мутантного хантингтина, обеднение дендритного дерева, снижение мембранного потенциала митохондрий, а также увеличение ко-локализации белков МАМ, коррелирующее с количеством повторов САG у пациентов.

Таким образом, модель индуцированных нейронов стриатума отражает основные патологические изменения на клеточном уровне и может быть использована для исследования болезни Хантингтона и тестирования лекарственных средств в ходе доклинических испытаний.

**ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ, СОПРЯЖЕННАЯ
СО СТРЕССОМ МАТЕРИ ПРЕДРАСПОЛАГАЕТ К
НАРУШЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ
РЕЦЕПТОРОВ В МОЗГЕ ВЗРОСЛЫХ КРЫС, НЕ ВЛИЯЯ НА
МЕТАБОЛИЗМ АЦЕТИЛХОЛИНА В ПРОЦЕССЕ
ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ**

**Потапова С.С.^{1*}, Воронова М.В.², Зуган Е.А.^{1,2}, Стратилов
В.А.¹, Ветровой О.В.¹**

¹ Институт Физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*² Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: sofiya-potapova@mail.ru*

Потребление никотина ежегодно убивает до 8 миллионов человек. На сегодняшний день факторами риска никотиновой зависимости

считаются не только генетические и социальные причины, но и нарушения эпигенетической программы в результате патологий пренатального развития.

Ранее на крысах мы показали, что стрессорный ответ матери на гипоксию во время беременности предопределяет склонность к никотиновой зависимости у взрослого потомства.

Данное исследование направлено на изучение влияния пренатальной гипоксии (ПГ), сопровождающейся стрессорным ответом матери, на метаболизм ацетилхолина в развивающемся мозге и глюкокортикоид-зависимую экспрессию ацетилхолиновых рецепторов *chrna4* и *chrna7* в развивающемся мозге и в структурах мозга взрослых крыс.

Работы проведены на эмбрионах (15, 16, 17, 20 сутки эмбриогенеза) и взрослых (3 месяца) контрольных и ПГ крысах линии Вистар. В развивающемся мозге ПГ крыс не было обнаружено изменений активности холинацетилтрансферазы, ацетилхолинэстеразы и концентрации ацетилхолина. Однако в мозге ПГ крыс было обнаружено снижение экспрессии *chrna4* на 15-й день и повышение экспрессии *chrna7* на 15-й и 16-й дни эмбриогенеза. Во взрослом возрасте последствия ПГ проявлялись в снижении экспрессии *chrna4* и *chrna7*. При этом у взрослых ПГ крыс хроническое потребление никотина не влияло на экспрессию *chrna4* и *chrna7* по сравнению с интактными ПГ животными, в то время как в структурах мозга контрольных крыс потребление никотина вызывало снижение экспрессии *chrna4* и *chrna7* по сравнению с интактным контролем.

Таким образом, пренатальная гипоксия вызывает нарушение экспрессии *chrna4* и *chrna7* у взрослых крыс, не влияя на метаболизм ацетилхолина в процессе эмбрионального развития.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-75-00003).

**ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ДЛИННЫХ
НЕКОДИРУЮЩИХ РНК ПРИ ЭПР-СТРЕССЕ**
**Пукаева Н.Е.^{1,2*}, Залевская В.Н.¹, Овчинников Р.К.^{1,2},
Кухарский М.С.^{1,2}**

¹ *Институт физиологически активных веществ ФИЦ проблем
химической физики и медицинской химии РАН,
Черноголовка, Россия*

² *Российский национальный исследовательский медицинский
университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*
E-mail: nadya.pukaeva@mail.ru*

Длинные некодирующие РНК (днРНК) – молекулы длиной более 200 нуклеотидов, которые выполняют в клетке регуляторную роль и не кодируют белки. Нарушения в работе ряда днРНК ассоциированы с развитием патологических состояний нервной системы, включающих нейродегенеративные (НДЗ) и психические заболевания. Общими патогенетическими признаками НДЗ являются нарушение белкового гомеостаза и как следствие развитие стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР-стресс), что в конечном итоге приводит к гибели нейронов путем апоптоза. Среди днРНК можно выделить стресс-чувствительные и стресс-регулирующие, которые активируются или ингибируются при клеточном стрессе и участвуют в стрессовом ответе, либо влияют на возникновение стресса. Целью данной работы было выявление днРНК, которые изменяют свой уровень экспрессии в ответ на ЭПР-стресс в первичных нейрональных культурах. Нами был проведен транскриптомный анализ первичных нейрональных культур после индукции в них ЭПР-стресса, путем обработки ингибитором протеасом MG132. В результате был выделен ряд дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), кодирующих днРНК. При индукции ЭПР-стресса в культурах наблюдалось изменение экспрессии днРНК принимающих участие в подавлении ЭПР-стресс-индуцированного апоптоза, например, снижался уровень Peg13 и повышался уровень Snhg1 и Kcnq1ot1. Уровень днРНК Malat1, участвующей в клеточной пролиферации был значимо выше

в культурах после ЭПР-стресса. Для моделирования конкретного типа протеинопатии, связанной с развитием нейродегенерации первичные культуры трансфецировали плазмидным вектором, кодирующим мутантную форму белка TDP43, который способен накапливаться и агрегировать в нервных клетках, вызывая ЭПР-стресс и клеточную гибель. При этом в культурах после трансфекции уровень днРНК Peg13, Snhg1 и Malat1 не изменялся, а уровень Kcnq1ot1 снижался. Таким образом ЭПР-стресс-регулируемые днРНК по-разному изменяют свою экспрессию в зависимости от механизма развития ЭПР-стресса. Работа была выполнена в рамках Государственного задания ИФАВ (тема № FFSG-2024-0023).

**ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ И
ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО
РЕТИКУЛУМА В ДЕНДРИТНЫХ ШИПИКАХ
ГИПОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ ЗАВИСИТ ОТ
ДИНАМИЧЕСКИХ МИКРОТРУБОЧЕК**
**Раковская А.В.^{1,2*}, Волкова Е.И.¹, Безпрозванный И.Б.^{1,2},
Пчицкая Е.И.^{1,2}**

*Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра
Великого, Санкт-Петербург, Россия
E-mail*: jonatepl@gmail.com*

Один из механизмов кальциевого сигналинга в нейронах - депо-управляемый вход кальция (ДУВК), который активируется при уменьшении концентрации кальция в гладком эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Белок-кальциевый сенсор STIM (stromal interacting molecule), расположенный на мембране ЭР, при истощении ЭР транслоцируется к клеточной мембране, образуя кластеры и индуцируя вход кальция. Нарушение ДУВК наблюдается при болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона. В электронеозбудимых клетках белок EB1 (end-binding), который связывается с положительным концом тубулиновой микротрубочки, контролирует олигомеризацию STIM1 и ДУВК. Ранее было

показано, что гомолог STIM2, специфичный для зрелых дендритных шипиков, взаимодействует с белком EB3, и это взаимодействие играет важную роль в формировании дендритных шипиков. Однако информация о роли взаимодействия с белками EB в кластеризации STIM2 и перемещении ЭР в нейронах пока отсутствует.

В данном исследовании была показана различная роль динамических тубулиновых микротрубочек в регуляции ДУВК, индуцируемого белками STIM1 и STIM2. Обнаружено, что при разрыве связи с тубулиновыми микротрубочками STIM2 снижает нДУВК и распределение кальция между шипиком и дендритом. Также было показано, что при внесении мутации белок STIM2 образует меньше кластеров, в то время как кластеры нормального варианта белка STIM2 при опустошении ЭР перемещаются из шеек в головки дендритных шипиков первичных гиппокампальных нейронов. Продемонстрировано, что при гиперэкспрессии мутантного варианта белка STIM2 происходит реконструктуризация ЭР в соме нейрона, уменьшая критерий гомогенности изображений. Гиперэкспрессия белка STIM2 приводит к увеличению числа шипиков, содержащих шипиковый аппарат, специальной клеточной органеллы, формируемой ЭР.

Работа поддержана грантом в рамках государственного задания FSEG-2024-0025.

РАЗРАБОТКА РЕЛЕВАНТНОЙ МОДЕЛИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИМИТАЦИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

Рыкунова Е.Б.*, Микеладзе М.А., Гужова И.В., Лазарев В.Ф.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: rykunova.lisa@gmail.com*

Нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, вызывают прогрессирующую деградацию нервной ткани. Разработка модели нервных клеток человека позволяет более точно изучить молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе

нейродегенеративных процессов, не прибегая к модели на животных. Такие модели могут быть использованы для исследования эффективности потенциальных лекарственных препаратов, а также для понимания основных процессов, приводящих к гибели нервных клеток. Ранее в нашей лаборатории была продемонстрирована дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток человека в нейрональный фенотип при помощи изменений компонентов среды, в которой культивируются клетки. В результате исследования влияния различных сред для дифференцировки фибробластов крысы DFK-3, было установлено, что уровень экспрессии генов основных нейрональных маркеров в клетках DFK3-Neu (эмбриональные фибробласты после нейрональной дифференцировки) в среднем в 2-4 раза превышает их уровень экспрессии в клетках DFK3. Повышение экспрессии маркеров зрелых нейронов свидетельствует о приобретении клетками нейронального фенотипа. На молекулярном уровне, вторичные повреждения, приводящие к усугублению нейродегенеративных процессов, выражаются в токсичных метаболитах гибнущих клеток, которые могут накапливаться в спинномозговой жидкости. Для анализа вторичных повреждений мы проводили культивирование дифференцированных клеток DFK3-Neu в присутствии СМЖ травмированных крыс. Таким образом, нами была разработана новая удобная модель для оценки вторичных повреждений после ЧМТ. Ключевой особенностью представленной модели является то, что она позволяет оценить цитотоксическое действие СМЖ травмированных крыс на культуру клеток крысы, обладающих нейрональным фенотипом. Подобные модели могут быть использованы при изучении вторичных повреждений при нейродегенеративных процессах различного генеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 24-45-10013.

**ИЗМЕНЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИНАМИКИ В
НЕЙРОГЕННОЙ НИШЕ ГИППОКАМПА ПРИ ГИПОКСИИ**
**Рябова М.С.^{1,2} *, Егорова А.В.^{1,2}, Федорова Е.Н.^{1,2}, Подопригра
В.В.¹ Скворцова К.А.^{1,2}, Баранич Т.И.^{1,2}, Воронков Д.Н.²,
Глинкина В.В.¹, Сухоруков В.С.^{1,2}**

*¹ Российский Национальный Исследовательский медицинский
Университет им. Н.И. Пирогова Министерства*

Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Научный центр неврологии, Москва, Россия

E-mail: masarabova9411@gmail.com*

Введение: Гипоксия вызывает структурно-функциональные изменения в нескольких областях мозга, в частности в гиппокампе, играющем ключевую роль в процессах формирования памяти. В субгранулярной зоне зубчатой извилины расположена уникальная нейрогенная ниша, где фиксируются явления нейрогенеза в постнатальном периоде. Экспериментальные работы последних лет демонстрируют изменение баланса митохондриальной динамики в нейронах при гипоксии. Данная модификация является важным регуляторным параметром развития стволовых популяций. В этой связи актуальным остается вопрос: какую роль играет изменение митохондриальной динамики в модуляции процессов нейрогенеза в условиях гипоксии.

Цель исследования: Оценить взаимоотношения между маркерами митохондриальной динамики и нейрогенеза в нейронах зубчатой извилины гиппокампа при экзогенной гипоксии.

Материалы и методы: Умеренной гипобарической (5000 м) гипоксии подвергали 2 группы крыс: 8 и 12 эпизодов по 60 мин ежедневно. Контролем служили интактные крысы. Иммунофлуоресцентным методом выявляли: даблкортин (DCX, маркер незрелых нейронов) и активатор деления митохондрий Dtp1 в нейронах разных слоев гиппокампа. С помощью программы ImageJ оценивали интенсивность окрашивания. Статистическую обработку выполняли в программе GraphPad Prism, используя дисперсионный анализ.

Результаты: В субгранулярной зоне, где фиксируются процессы нейрогенеза, при 8 эпизодах гипоксии количество DCX+ клеток

достоверно не отличалось от контроля; только после двенадцатикратного воздействия наблюдалось значимое сокращение количества незрелых нейронов. Полученные данные, с одной стороны, свидетельствуют о снижении интенсивности нейрогенеза, с другой – могут быть связаны с ускорением созревания нейронов. Экспрессия Dpr1 увеличилась в гранулярном и субгранулярном слоях, что может объясняться индуцирующим влиянием гипоксии на деление митохондрий.

Выводы: Наши результаты показывают, что критическое действие гипоксии на дифференцировку нейтральных предшественников в гиппокампе может быть опосредовано изменениями в них митохондриальной динамики.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ТИРАМИНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА КРЫСЫ

Свитко С.О. *, Невский Е.С., Шайдуллова К.С., Ситдикова Г.Ф.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет,

Казань, Россия

E-mail: palmtree-web@yandex.ru*

После обнаружения нового типа рецепторов, связанных со следовыми аминами (TAAR-рецепторы), началось активное изучение их физиологической роли. Существуют как экзогенные (поступление с пищей), так и эндогенные (декарбоксилирование катехоламинов) источники следовых аминов. Известно, что избыточное накопление следовых аминов ассоциировано с гипертезией и возникновением головных болей (Sanlier, Bektesoglu, 2021). Присутствие TAAR-рецепторов показано во многих структурах ЦНС, а также в нейронах спинномозговых ганглиев и ганглии тройничного нерва, вовлеченных в ноцицептивный процесс (Zhang et al., 2023) (Rutigliano et al., 2018). Однако, роль этой медиаторной системы в механизмах ноцицепции не изучена. Цель работы – выявление влияния различных концентраций антагониста TAAR-рецепторов, тирамина (TYR), на электрическую активность тройничного нерва крысы.

Эксперименты проводились на самцах (4 – 8 нед.) крыс линии Wistar. В работе использовали электрофизиологический метод регистрации потенциалов действия (ПД) тройничного нерва, иннервирующего твердую мозговую оболочку в препарате полочерепа крысы (Kogoleva et al., 2023). Для исследования влияния TYR на частоту возникающих ПД, нами были использованы концентрации 5 мкМ, 10 мкМ.

При аппликации TYR в концентрации 5 мкМ не наблюдалось увеличения частоты ПД по сравнению с контролем. В контроле частота ПД составляла $260,5 \pm 106$ ПД за 5 минут, к 5-й минуте аппликации TYR (5 мкМ) – $286 \pm 133,8$ ПД за 5 минут, к 10-й минуте аппликации – $255,3 \pm 95,7$ (n = 8). При аппликации TYR (10 мкМ) наблюдалось достоверное увеличение частоты ПД. В контроле частота ПД составляла $288,2 \pm 80,2$ ПД за 5 минут, к 5-й минуте аппликации TYR (10 мкМ) – $520,8 \pm 130,3$ ПД за 5 минут (p = 0.01443; n = 10), к 10-й минуте аппликации – $586,2 \pm 148,6$ ПД за 5 минут (p = 0.04883; n = 10).

Заключение. Таким образом, аппликация агониста TAAR-рецепторов, тирамина, в концентрации 10 мкМ приводит к достоверному увеличению частоты ПД в афферентах тройничного нерва крысы. Полученные данные вносят вклад в понимание роли следовых аминов и TAAR-рецепторов в патогенезе мигрени в структуре, считаемой местом возникновения болевого сигнала при данной патологии.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ БЕЛКА-РЕГУЛЯТОРА ДЕЛЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ В РАЗЛИЧНЫХ УЧАСТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ СТАРЕНИИ

Скворцова К.А.^{1,2*}, Баранич Т.И.^{1,2}, Омарова З.М.², Бадлаева А.С.¹, Воронков Д.Н.¹, Глинкина В.В.², Сухоруков В.С.^{1,2}

¹ *Научный центр неврологии, Москва, Россия*

² *Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

E-mail: skvortsova_ka@mail.ru*

Введение. Известно, что митохондрии в клетках постоянно и с различной скоростью претерпевают деление и слияние; баланс

между последними регулирует общее количество митохондрий, а сдвиги этого баланса могут играть важную роль в регуляции различных физиологических и патологических процессов.

Старение характеризуется нейродегенеративными изменениями, развитие и прогрессирование которых связано со множественными клеточными нарушениями в нейронах, в том числе с дисфункцией митохондрий и, вероятно, нарушениями их динамики. Ранее нами было показано снижение количества митохондрий в нейронах некоторых зон ГМ человека и лабораторных животных при старении (Бадлаева, 2023). Возможными причинами снижения количества митохондрий при старении могут быть изменения деления митохондрий.

Цель. Иммуногистохимическая оценка маркера деления митохондрий в нейронах различных зон гиппокампа, сенсорной и моторной зон коры при старении.

Материалы и методы. Исследован аутопсийный материал гиппокампа и коры постцентральной и прецентральной извилин ГМ умерших пациентов в возрасте 75 лет и старше (5 пациентов). Аналогичный материал умерших от внезапной сердечной смерти молодых людей составил группу контроля. Проведен иммуногистохимический анализ распределения маркера DRP1 (активатор деления митохондрий) в нейронах зон гиппокампа CA1, CA2, CA3, зубчатой извилине(DG) и в нейронах II, III и V слоев сенсорной и моторной зон коры ГМ. Оценка интегральной плотности проводилась в программе LeicaQWin. Статистическая обработка данных - метод Anova. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ НЦН.

Результаты. В зонах CA3 и DG гиппокампа количество маркера DRP1 достоверно снижалось относительно контроля у пожилых людей. В то же время в нейронах III слоя сенсорной зоны и V слоя как в двигательной, так и в сенсорной зонах коры уровень этого маркера повышался в возрастной группе относительно контроля.

Выводы. В гиппокампе, моторной и сенсорной коре ГМ при старении меняется содержание активатора деления митохондрий, но

по-разному. Это может свидетельствовать о различной роли измененной с возрастом митохондриальной динамики в разных зонах ГМ.

**ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ И СТРЕССА
МАТЕРИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА CHRNA7 И РАЗВИТИЕ
НИКОТИНОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ ВО ВЗРОСЛОМ
ВОЗРАСТЕ**

**Стратилов В.А.^{1*}, Ветровой О.В.^{1,2}, Потапова С.С.^{1,2}, Тюлькова
Е.И.¹**

*¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

*² Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: stratilov.v@infran.ru*

Пренатальные патологии, такие как гипоксия плода или пренатальный стресс, все чаще рассматриваются как причины нейropsychических заболеваний в более позднем возрасте. Эти патологии часто возникают одновременно, что затрудняет дифференцировку их индивидуальных эффектов. Чтобы решить эту проблему, мы смоделировали пренатальную тяжелую гипоксию (PSH), ассоциированную со стрессом матери, или пренатальную внутриутробную ишемию (PII). У взрослых PSH крыс, как и у PII крыс наблюдались повышенные уровни HIF1 α в гиппокампе (HPC), но только у PSH крыс наблюдалось нарушение циркадного ритма кортикостерона, что демонстрирует пригодность обеих моделей для целей исследования.

Сравнивая две модели, выяснилось, что сама по себе гипоксия в пренатальном периоде не является предрасполагающим фактором для дальнейшего развития никотиновой зависимости. В частности, группа PSH была единственной, которая продемонстрировала поведенческие признаки никотиновой зависимости в тесте на избегание места ассоциированного с введением никотина, и

нормализацию aberrантного латентного периода в тесте стартл рефлекса при введении никотина.

Повышенные уровни DARPP-32, фосфорилированного по треонину 34 (pThr34DARPP-32) в прилежащем ядре (NAc) у PSH крыс, но не в группе ПИ, позволяют предположить, что ослабленная глутаматергическая эфферентная иннервация является важным патогенетическим звеном для PSH-ассоциированной никотиновой зависимости. Кроме того, снижение экспрессии $\alpha 7$ nAChR наблюдалось в префронтальной коре (PFC) и в НРС, ключевых областях, проецирующих глутаматергические афференты на NAc. В обоих структурах были обнаружены сильные корреляции между экспрессией глюкокортикоидных рецепторов (GR), кодируемых геном *nr3c1*, и субъединицами $\alpha 7$ nAChR, кодируемыми геном *chrna7*.

Таким образом, нарушения в глюкокортикоидной системе, наряду с глюкокортикоид-зависимой экспрессией гена *chrna7*, связанной со стрессорной реакцией матери на гипоксию в пренатальном периоде, являются предрасполагающим фактором к развитию никотиновой зависимости во взрослом возрасте.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ #22-75-00003.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕРВНО- МЫШЕЧНОГО СИНАПСА МЫШИ НА РАННЕЙ СТАДИИ СТАРЕНИЯ

**Токмакова А.Р.* , Сибгатуллина Г.В., Пономарева А.А.,
Бухараева Э.А., Сальников В.В.**

*Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН,
Казань, Россия*

E-mail: annna.tok@gmail.com*

Старение приводит к значительным изменениям двигательных функций организма, одним из которых является саркопения - уменьшение мышечной массы и силы. Эти морфологические и функциональные изменения затрагивают двигательные нейроны и волокна скелетных мышц, но мало что известно о процессах,

которые происходят в нервно-мышечном контакте на ранних стадиях старения. Целью данного исследования было сравнение морфологии нервно-мышечного синапса в диафрагмальной мышце взрослых половозрелых (3 месяца) и начинающих стареть (12 месяцев) мышей. Электронно-микроскопическое исследование синапса показало, что периметр постсинаптической области увеличился на 22% у 12-ти месячных мышей по сравнению с 3-месячными мышами. Число складок на единицу длины синаптической щели также увеличилось на 17%. При этом, в нервных терминалях 12-ти месячных мышей количество синаптических везикул на 1 мкм² снизилось на 13%. Иммуногистохимический анализ показал, что в 12 месяцев на 43% уменьшилась интенсивность флюоресценции белка синапсина, участвующего в экзоцитозе синаптических везикул. При старении в нервных окончаниях выросло на 35% число митохондрий с электронно-прозрачным матриксом без четко выраженных крист. Мышечные волокна у 3-х и 12-месячных мышей также отличались. Электронная микроскопия показала, что с возрастом почти в два раза выросла длина саркомера от 2-2,2 мкм (3 месяца) до 4 мкм (12 месяцев) за счет увеличения размера И-диска. В стареющих мышечных волокнах межфибрилярные митохондрии размером 0,5-0,7 мкм (по длинной оси) находились параллельно друг другу в области И-диска, с обеих сторон от Z-линии. В миофибриллах молодых животных такие митохондрии были меньше (0,3-0,5 мкм) и располагались хаотично между пучками миофибрилл в области Z-линии. Полученные данные указывают на существенные морфологические изменения как структуры нервно-мышечного синапса, так и мышечных волокон при старении. Это может быть причиной для развития последующих функциональных нарушений работы двигательного аппарата.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (проект № 23-15-00124).

СРАВНЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ИНСУЛИНОВОГО СЕМЕЙСТВА НА МОДЕЛИ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ПЕРЕДНЕГО МОЗГА КРЫС

Третьякова А.Д.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М.

Сеченова РАН, Санкт Петербург, Россия

E-mail: alina_tretyakova_2004@list.ru*

Инсулин и инсулино-подобный фактор роста-1 (IGF-1), относящиеся к пептидам инсулинового семейства, являются одними из основных нейротрофических факторов. Поскольку инсулин и IGF-1 оказывают вазодилататорный, противовоспалительный и антитромбический эффекты, они могут быть использованы при терапии ишемических инсультов. Для их доставки в мозг широко используется интраназальный способ введения. В целях сравнения эффективности нейропротекторного действия данных пептидов использовалась модель глобальной ишемии переднего мозга в сочетании с гипотензией, при которой препараты вводились крысам интраназально в одинаковой дозе 0,6 МЕ как до ишемического эпизода, так и после, а затем в течение 7 дней реперфузии. Для подсчета количества живых нейронов в CA1 поле гиппокампа производилось окрашивание срезов мозга по модифицированному методу Нисслю. Оклюзия каротидных артерий на 13 мин в сочетании с гипотензией приводила к тому, что число живых нейронов в CA1 поле гиппокампа снижалась с $58,9 \pm 1,6$ до $22,4 \pm 4,3$ клеток/300 мкм ($p < 0,05$). Несмотря на то, что инсулин и IGF-1 активируют схожие сигнальные каскады, выявились различия в защитном действии. В том случае, если IGF-1 первый раз вводился до ишемического эпизода и далее ежедневно в течение 7 дней реперфузии, он достоверно увеличивал число живых нейронов с $22,4 \pm 4,3$ до $41,5 \pm 2,6$ клеток/300 мкм ($p < 0,05$). Если же первое введение выполнялось после ишемического эпизода, то защитный эффект отсутствовал и количество живых нейронов достигало $22,2 \pm 1,3$ клеток/300 мкм, что не отличается от группы ишемических крыс, не

получавших никаких препаратов. Сравнивая эффекты инсулина при различных режимах введения, было установлено, что его впрыскивание после ишемического эпизода и далее в течение 7 дней реперфузии оказывало более выраженное защитное действие по сравнению с группой, в которой инсулин первый раз вводился животным до ишемии, в результате чего окрашивание выявило $38,2 \pm 6,7$ и $28,1 \pm 5,6$ нейронов/300 мкм, соответственно. Поскольку при выборе нейропротектора предпочтение отдается тем препаратам, которые способны предотвращать дальнейшую гибель нейронов после травматического воздействия, инсулин может оказаться одним из них, что требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГЗ № 075-00264-24-00.

ЭФФЕКТЫ ИОНОВ ЦИНКА НА СЕКРЕЦИЮ НЕЙРОМЕДИАТОРА В ДИАФРАГМЕ МЫШИ

Хазиев А.Н.^{1*}, Ценцевичский А.Н.¹, Петров А.М.^{1,2}

¹ *Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ*

РАН, Казань, Россия

² *Министерства здравоохранения Российской Федерации,*

Казань, Россия

E-mail: khaziev.an16@physics.msu.ru*

Цинк – незаменимый микроэлемент, входящий в состав функциональных групп ферментов и обладающий сигнальной ролью. Около 10% белков млекопитающих являются цинксодержащими. В организме человека Zn^{2+} распределен неравномерно и большая его часть (60%) сосредоточена в скелетных мышцах. Целью данного исследования было выявление эффектов ионов цинка на синаптические процессы в диафрагме мышцы. Основные эксперименты были проведены на молодых животных (3-4 месяца).

В ходе электрофизиологических исследований было обнаружено, что наличие Zn^{2+} во внеклеточной среде (в концентрациях 1 нМ, 10 нМ, 1 мкМ и 10 мкМ) приводит к снижению вызванной секреции в

ответ на одиночные стимулы и частоты спонтанной секреции нейромедиатора. Таким образом, цинк способен выступать негативным регулятором нейросекреции ацетилхолина даже в наномолярных концентрациях.

Стимуляция экзоцитоза синаптических везикул немедленно готового к освобождению пула гипертоническим раствором сахарозы (100 мМ) выявила, что внеклеточные ионы цинка в диапазоне концентраций 0.1 нМ - 10 мкМ вызывают снижение максимальной частоты выделения квантов нейромедиатора и скорости ее нарастания. Это указывает на уменьшение размера пула наиболее готовых к экзоцитозу везикул при наличии цинка во внеклеточной среде.

Отслеживание экзоцитоза синаптических везикул с использованием флуоресцентного маркера FM1-43 при продолжительной стимуляции нерва с частотой 20 Гц показало, что присутствие 10 нМ цинка во внеклеточном растворе оказывает подавляющее действие на вовлечение синаптических везикул в экзоцитоз.

Известно, что с возрастом возникает недостаток ионов цинка. Дополнительные первоначальные эксперименты на стареющих мышцах (возраст 12 месяцев) указывают на ослабление эффектов ионов цинка на экзоцитоз синаптических везикул с возрастом.

Работа частично поддержана грантом РФФ 23-15-00124.

**ВЛИЯНИЕ АГОНИСТА PPAR β/δ GW0742 В НА
ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ГЛИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ЛИТИЙ-
ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ У КРЫС**

Харисова А.Р.* , Рогинская А.И., Коваленко А.А., Зубарева О.Е.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М.

Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: adeliaharisova.ah@gmail.com*

Эпилепсия – распространенное, сложно поддающееся лечению заболевание. Эффективной терапии эпилепсии не существует для 30% пациентов. В последние годы широко обсуждается роль астро- и микроглиальных белков в патогенезе эпилепсии. Среди

препаратов, предположительно способных повлиять на экспрессию генов глиальных клеток, рассматриваются агонисты рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR α , β/δ , γ).

В данной работе изучалось влияние введений агониста PPAR β/δ GW0742 на экспрессию генов астро- и микроглиальных белков, вовлеченных в развитие эпилептогенеза, в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии (ВЭ) у крыс.

В возрасте 7-8 недель крысам самцам Вистар вводили раствор LiCl (в/б, 127 мг/кг), через сутки метилскополамин (в/б, 1 мг/кг), через 30 минут — пилокарпин (в/б, 20-30 мг/кг) для индукции модели ВЭ. Контрольной группе крыс пилокарпин не вводили. GW0742 (5 мг/кг, растворенный в DMSO) вводили в/б в течение 7 дней после индукции судорог. Через сутки после последнего введения производили забор мозга для анализа экспрессии генов микро- и астроглиальных белков, вовлеченных в регуляцию эпилептогенеза (*Gfap*, *Aif1*, *Il1b*, *Nlrp3*, *Lcn2*, *Ptx3*, *S100a10*, *Gbp2*, *Nos2*, *Arg1*, *Fgf2*, *Bdnf*) с использованием ОТ-ПЦР в реальном времени в дорзальном гиппокампе и височной коре.

Экспрессия большинства исследованных генов менялась при эпилептогенезе, наблюдалось выраженное усиление экспрессии провоспалительных генов и маркеров активации глиальных клеток. Введение GW0742 в височной коре ослабляло повышенную экспрессию генов маркера активации микроглии *Aif1* и маркера проспалительного A1 фенотипа астроглии *Lcn2*, а также уменьшало экспрессию проэпилептогенного ростового фактора *Bdnf*. В дорзальном гиппокампе GW0742 нивелировал снижение продукции мРНК маркера защитного M2 фенотипа микроглии *Arg1*.

Таким образом, в модели височной эпилепсии введение GW0742 ослабляет развитие способствующих эпилептогенезу изменений экспрессии генов глиальных белков.

Работа выполнена при поддержке РФФ, грант № 23-25-00480.

**МУТАГЕНЕЗ UGR9-1, СЕЛЕКТИВНОГО ЛИГАНДА ASIC3
КАНАЛА, ПРИВОДИТ К ПОЯВЛЕНИЮ
ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ МИШЕНИ
ASIC1a, НО СНИЖАЕТ АНАЛЬГЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ**

**Хасанов Т.А.^{1,2*}, Козлов С.А.², Андреев Я.А.²,
Осмаков Д.И.²**

¹ *Московский физико-технический институт, Долгопрудный,
Россия*

² *Институт биоорганической химии, Москва, Россия*
E-mail: hasanov.ta@phystech.edu*

Кислоточувствительные ионные каналы (ASIC), являющиеся натрий-селективными протонными сенсорами, привлекают внимание в качестве фармакологических мишеней. Изоформа ASIC1a, наиболее распространенная в центральной нервной системе, играет важную роль в синаптической пластичности, тревожных состояниях, нейродегенерации и т.д. В периферической нервной системе ASIC1a также широко представлена наряду с ASIC3, который в свою очередь играет важную роль в передаче сигналов боли, механической чувствительности и воспалительной гипералгезии. Однако вклад ASIC1a в периферические функции до сих пор точно не установлен. Для выяснения специфических функций ASIC незаменимыми инструментами являются пептидные лиганды, способные модулировать эти каналы. Используя молекулярное моделирование на основе пептида морской анемоны Ugr9-1, селективно ингибирующего ASIC3 каналы, мы разработали мутантный пептид (A23K), который сохранял ингибирующий эффект на ASIC3 (IC_{50} 9,39 мкМ) и проявлял дополнительный ингибирующий эффект на ASIC1a (IC_{50} 6,72 мкМ) в электрофизиологических экспериментах. Важнейшее взаимодействие между остатком Lys23 пептида A23K и остатком Asp355 в домене большой палец канала ASIC1a, предсказанное молекулярным моделированием, было подтверждено направленным мутагенезом канала. Однако в экспериментах *in vivo* пептид A23K продемонстрировал значительное снижение или потерю

анальгетических свойств по сравнению с Ugr9-1 дикого типа. Таким образом, с помощью пептида A23K мы показывали, что дополнительная негативная модуляция канала ASIC1a в периферической нервной системе может снизить эффективность обезболивающего препарата. Эти результаты убедительно иллюстрируют сложный баланс, необходимый при разработке методов лечения периферической боли, ориентированных на ASIC. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №22-75-10021.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА СИЛИМАРИНА ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Чалабов Ш.И.^{1*}, Кличханов Н.К.²

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН,

Санкт-Петербург, Россия

² Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

E-mail: biowulf05@gmail.com*

Оксидативный стресс – одно из ключевых звеньев повреждения нервной ткани при церебральной ишемии. Силимарин – комплекс биофлавоноидов семян расторопши пятнистой. Применяется как гепатопротектор с антиоксидантным эффектом. Некоторые литературные источники указывают на нейропротекторный потенциал силимарина. Цель работы – исследование антиоксидантных свойств силимарина при ишемии головного мозга. Опыты выполнены на 18 крысах массой ~200 г., распределенных на 3 группы: 1 – ложнооперированные (контроль); 2 – ишемия/реперфузия; 3 – ишемия/реперфузия + силимарин. Неполная ишемия головного мозга воспроизводилась путем окклюзии обеих сонных артерий в течение 1 ч. Из коры головного мозга выделяли синаптосомы и синаптические мембраны, в которых определяли содержание карбонильных и тиоловых групп (SH-группы), малоновый диальдегид (МДА), содержание восстановленного глутатиона (GSH) и активность гидрофильных антиоксидантов.

Ишемия и последующая реперфузия приводит как к повышению исходного содержания МДА, так и увеличению уровня МДА в среде Фентона ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{ЭДТА}$) на 67% и 48% соответственно. Аналогичную динамику демонстрирует исходный и металл-зависимый уровень карбонильных групп (рост на 115 и 81% соответственно). Содержание SH-групп в белках синапсом при постишемической реперфузии снижается на 41%, содержание GSH – на 51,4 %, а общая антиокислительная активность – на 39%.

Диета с биофлавоноидами расторопши предотвращает повышение исходного уровня МДА и его накопление в среде Фентона. На фоне препарата не повышается количество как исходных карбонильных групп, так и их уровень в среде Фентона. При этом не происходит снижения количества SH-групп, содержания GSH и общей антиокислительной активности.

Таким образом, постишемическая реперфузия стимулирует окислительную модификацию липидов и белков синапсом, что свидетельствует об интенсивном образовании свободных радикалов в нейронах. В то время как биофлавоноиды расторопши пятнистой способны оказывать антиоксидантное нейропротекторное действие в условиях церебральной ишемии/реперфузии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Госзадания № 075-00264-24-00.

ЦИНК-ОПОСРЕДОВАННЫЙ МЕХАНИЗМ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ ГЛАУКОМЕ

**Шебардина Н.Г.^{1*}, Булгаков Т.К.², Мойсенович А.М.²,
Чистяков Д.В.¹, Зерний Е.Ю.¹**

¹ *Научно-исследовательский институт Физико-химической
биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия*

² *Московский государственный университет им. М.В.*

Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: natuskasheb@gmail.com*

Глаукома – это оптическая нейропатия, связанная с гибелью ганглиозных нейронов сетчатки, медиатором которой могут быть

ионы секретируемого цинка. Работа посвящена исследованию сигнальных механизмов, опосредующих нейротоксические эффекты цинка. В качестве клеточных моделей сетчатки использовались линии пигментного эпителия, нейробластомы и ретинобластомы человека. Цитотоксические эффекты цинка определяли с помощью клеточных тестов и проточной цитометрии. Транскриптомные изменения регистрировали секвенированием на платформе Illumina. Для дифференциально-экспрессирующихся сигнальных белков анализировали аффинность к ионам цинка (с применением флуоресцентных зондов и атомно-адсорбционной спектроскопии) и уровень секреции (методом иммуноблоттинга). Эффекты цинка в отношении активности отобранных белков исследовали методами иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии, а также с помощью анализа активации регулируемых ими рецепторов методом таргетной ВЭЖХ-МС.

Установлено, что клетки сетчатки обладают чувствительностью к цинковому стрессу, индуцирующему их гибель путем апоптоза. На фоне воздействия цинком происходит подавление экспрессии генов, связанных с нейротропной активностью, при одновременном увеличении секреции соответствующих белков. Примечательно, что указанные белки способны непосредственно координировать цинк, что приводит к ингибированию их аксогенной, дифференцирующей и цитопротекторной активности за счет нарушения связывания со специфическими рецепторами. Таким образом, рост уровня мобильного внеклеточного цинка будет приводить к ингибированию нейротропной активности в сетчатке, что является одним из ключевых узлов патогенеза глаукомы, воздействие на который может быть перспективным вариантом лечения этого заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-15-00123 (эксперименты на клеточных моделях, средство нейротропных белков к цинку) и гранта РФФИ № 24-15-00171 (активность нейротропных белков в отношении рецепторов).

**ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ P2X3 РЕЦЕПТОРА НА
МИТОХОНДРИАЛЬНОЕ ДЫХАНИЕ ПЕРВИЧНОЙ
СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ ГИППОКАМПА МЫШЕЙ**

Шмигерова В.С.* , Зеленцова А.С., Скоркина М.Ю.,

Дейкин А.В.

*Белгородский государственный национальный исследовательский
университет, Белгород*

E-mail: nika.beliaeva@yandex.ru*

Введение. Согласно современным представлениям, рецептор P2X3 участвует в трансдукции болевых сигналов, опосредует активацию сенсорных нейронов в процессах ноцицепции и механотрансдукции, признан потенциальной терапевтической мишенью в лечении боли (Ford et al., 2012). Вместе с тем, доказано, P2X3 рецептор вовлечен в процесс индукции длительной депрессии в гиппокампе крысы (Wang et al., 2006), за счет индуцированного тока Ca^{2+} в ответ на АТФ (Khakh, 2001). Учитывая, что сигнальный путь кальция играет важную роль в зависимых от гиппокампа процессах памяти и когнитивного здоровья, он может являться потенциальной мишенью в лечении нейродегенеративных процессов, протекающих в мозге и зависящих от гиппокампа когнитивных функций (Heck et al., 2015). Целью работы явилось изучить влияние высокоселективного блокатора P2X3 рецептора на митохондриальное дыхание первичной смешанной культуры гиппокампа.

Материалы и методы. В работе использованы 2-х дневные мыши линии CD 1, полученные от половозрелых самок. Нейроны гиппокампа выделяли на холоде. Первичную смешанную культуру нейронов гиппокампа культивировали в 8-ми луночных планшетах *Cell Culture Miniplates* (Agilent, USA) для анализатора клеточного метаболизма *Seahorse XF HS mini* (Agilent, USA). из расчета 2×10^5 в 80 мкл нейробазальной среды. С целью фармакологической блокады рецептора P2X3 использовали высокоселективный блокатор 5-(5-йод-2-изопропил-4-метоксифеноксипиримидин-2,4-диамин) монохлоридная соль (Ro-4; Sigma-Aldrich) в конечной концентрации 12 нМ. Для оценки влияния блокатора Ro-4 на митохондриальную

функцию нейронов использовали набор MitostressTest kit (USA). Полученные экспериментальные данные обрабатывали, используя программу Wave 2.6 (USA).

Результаты. Под влиянием блокатора Ro-4 установлено увеличение потери протонов на 127% ($p < 0,05$) на фоне недостоверного увеличения не митохондриального дыхания, увеличение максимального дыхания на 39% ($p < 0,05$), усиление базального дыхания на 33% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Продукция АТФ была снижена до $24,04 \pm 0,33$ пмоль/мин, против контроля $48,5 \pm 0,52$ пмоль/мин.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о влиянии блокады P2X3 рецептора на митохондриальное дыхание нейронов гиппокампа. Усиление клеточного дыхания на фоне замедления продукции АТФ указывает на снижение митохондриальной активности в условиях блокады P2X3 рецептора.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ согл № 23-24-00600

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПАТТЕРНЫ РАЗВИТИЯ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ МОЗГА И КОГНИТИВНОЙ ХРУПКОСТИ

Шпилюкова К.А.^{1*}, Бондарь Н.И.^{1,2}, Комлева Ю.К.¹**

¹ *Научный центр неврологии, Москва, Россия*

² *Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*

E-mail: kristi14035@gmail.com*

В настоящее время существует тенденция по увеличению продолжительности жизни населения, в связи с улучшением качества жизни в странах с низкой смертностью. Полагается, что к 2050 году численность пожилых людей (> 60 лет) достигнет 2,1 миллиарда, что составит более 20% от всего населения мира (Aburto, J. et.al., 2020). На фоне такого увеличения популяции пожилых людей широко используется концепция хрупкости, которая указывает на повышенную уязвимость к различным проблемам со

здоровьем, связанную с уменьшением физиологических резервов, ассоциируемых со старением. Хроническое воспаление, а также клеточная сенесценция, сопровождаемая секреторным фенотипом, ассоциированным со старением (SASP), являются одними из главных причин развития траектории ускоренного старения. В связи с этим актуальным является изучение модуляции воспаления в качестве потенциальной стратегии, влияющих на клеточную сенесценцию.

Хромогенное окрашивание клеток подтвердило индукцию SA- β Gal в гиппокампе во время старения у WT мышей, но не у NLRP3 KO животных. Клетки в гиппокампе пожилых мышей демонстрировали более высокий уровень маркеров старения ($3,56 \pm 0,84$ %) по сравнению с группой взрослых животных ($1,02 \pm 0,23\%$ площади сенесцентных клеток) ($p=0,0281$).

При анализе экспрессии IL-1 β в срезах гиппокампа обнаружено значимое влияние генотипа ($p = 0,0003$). В гомогенатах гиппокампа пожилых WT животных уровень IL-1 β был значительно выше ($39,05 \pm 8,12$ пг/мг) по сравнению с группой взрослых WT мышей ($28,45 \pm 7,11$ пг/мг) ($p = 0,0294$). В группах мышей NLRP3 KO разного возраста мы не зарегистрировали значимых различий в экспрессии IL-1 β .

По мере взросления происходит повышение мРНК целевых генов, в связи с накоплением конечных продуктов гликирования (AGE/RAGE) вследствие нарушения метаболизма глюкозы и увеличением количества сенесцентных клеток, секретирующих SASP и неспособных к клеточному делению.

Секция «Стволовые клетки и регенеративная
биомедицина»

АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В РЕГЕНЕРАЦИИ АННЕЛИД

Бармасова Г.А.^{1*}, Старунов В.В.^{1,2}, Старунова З.И.¹,
Новикова Е.Л.²

¹ Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

E-mail*: barmasovagalina@yandex.ru

Среди животных одним из наиболее важных для изучения регенерации таксонов является тип Аннелиды. В то время как одни представители аннелид, такие как *Pygospio elegans*, способны отращивать и переднюю, и заднюю части тела, другие, например, *Platynereis dumerilii*, могут регенерировать только постериорно, а некоторые не регенерируют вовсе. Это делает возможным проведение сравнительных исследований для выявления причин подобных различий.

В регенерации аннелид важную роль играет активация пролиферации, благодаря которой формируется клеточный материал для образующейся бластемы. Одним из факторов, приводящих к активации пролиферации, возможно, является апоптоз соседних клеток. С помощью метода TUNEL мы показали, что у регенерирующих аннелид в области разреза происходит усиление апоптотической активности, которая затем снижается и уступает место пролиферации. В случае *P. dumerilii*, не способных к передней регенерации, у задних фрагментов в области разреза апоптотическая активность повышается значительно позднее и не снижается. Таким образом мы предполагаем, что своевременная активация апоптоза является необходимым условием для успешной регенерации у аннелид. Мы также использовали метод CellEvent, основанный на мечении активированных каспаз-3,7, для выявления апоптотирующих клеток, однако результаты оказались противоречивыми: клетки, помеченные CellEvent, не соответствовали клеткам, несущим метку TUNEL. На основании этого мы предположили, что в процессе апоптоза у аннелид

принимают участие другие белки, нежели у позвоночных и членистоногих.

Целью данной работы стал поиск генов, вовлеченных в процесс апоптоза у аннелид. Мы выявили белки, предположительно обладающие каспазной активностью или участвующие в регуляции апоптоза, используя транскриптомы интактных и регенерирующих *P. elegans* и *P. dumerilii*. Изучение распределения данных белков в ходе регенерации и сравнение полученных результатов может помочь пролить свет на механизмы апоптоза у аннелид и объяснить, почему некоторые из них способны к успешной регенерации, а некоторые – нет.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-14-00304) на базе ЦКП «Хромас» Научного парка СПбГУ и ЦКП «Таксон», в рамках темы госзадания № 122031100281-5.

ВЛИЯНИЕ БАЛАНСА АКТИВАЦИИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК МЕЗЕНХИМНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Басович Л.С.^{1,2,*}, Карелкин В.В.^{3,*}, Малашичева А.Б.¹

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: L.Basovich@yandex.com*

Остеогенез – сложный многоступенчатый механизм, включающий дифференцировку МСК в остеобласты и остеоциты, а также методы их взаимодействия для формирования и ремоделирования костной ткани. Сигнальный путь Notch идентифицирован как важный регулятор дифференцировки мезенхимных клеток-предшественников костной ткани. Существуют противоречивые данные о влиянии сигнального пути Notch на остеогенную дифференцировку МСК. Данное явление основано на зависимости

сигнального пути Notch от дозы, что связано с отсутствием шага амплификации сигнала.

Целью исследования являлось выявление остеогенной дифференцировки клеток мезенхимного происхождения в ответ на одновременную активацию/ингибирование компонента сигнального пути Notch. В качестве моделей клеток мезенхимного происхождения использовались первичные культуры остеобластов и гингивальных фибробластов человека. Ингибирование экспрессии рецепторов Notch1,3 осуществлялось методом РНК-интерференции. Активация рецепторов осуществлялась индукцией внутриклеточных доменов Notch1,3 (N1ICD, N3ICD). Для доставки использовался метод ко-транскрипции двумя лентивирусами с интервалом 24 часа. Запуск остеогенной дифференцировки осуществлялся добавлением дексаметазона, аскорбиновой кислоты и β -глицерофосфата в питательную среду. Уровень остеогенной дифференцировки оценивался окраской ализариновым красным.

Активация Notch1 с последующим ингибированием приводит к незначительному подавлению остеогенной дифференцировки. Напротив, ингибирование рецептора Notch1 с последующей активацией приводит к подавлению остео-дифференцировки. Однако рассмотренные комбинации ко-транскрипции активации/подавления экспрессии рецептора Notch3 не приводят к подавлению остео-дифференцировки. Данное явление может быть связано с результатами влияния дозозависимости рассматриваемых компонентов Notch на остео-дифференцировку: гиперактивация сигнального пути Notch при чрезмерной индукции N1ICD приводит к подавлению остео-дифференцировки клеток, в то время как гиперэкспрессия N3ICD не оказывает похожего эффекта.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 23-15-00320).

ФУНКЦИИ ПОЛИ(Ц)-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА РСБР1 В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

Бахмет Е.И.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: e.bakhmet@incras.ru

Поли(Ц)-связывающие белки выполняют множество функций, среди которых регуляция транскрипции и трансляции, сплайсинг, процессинг РНК, метаболизм железа в клетке. Ранее было показано, что эмбрионы мыши с нокаутом по *Pcbr1* погибают на ранних стадиях эмбриогенеза. В нашей работе мы показали, что *Pcbr1* на транскрипционном уровне выполняет различные функции в наивных и праймированных плюрипотентных стволовых клетках, до и после имплантации, соответственно.

В наивных эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) *Pcbr1* регулирует транскрипцию гена *Oct4*, и способствует его репрессии при дифференцировке ЭСК. Нокаут *Pcbr1* приводит к спонтанной спецификации ЭСК в направлении первичной энтодермы, при этом наблюдается сохранение экспрессии *Oct4* в таких клетках. Вероятнее всего, регуляторные сайты гена *Oct4* в отсутствие *Pcbr1* занимают другие факторы, которые не отвечают на сигналы дифференцировки.

С помощью методов ChIP-seq, RNA-seq и масс-спектрометрии мы показали, что при переходе ЭСК из наивного в праймированное состояние, *Pcbr1* также на транскрипционном уровне регулирует импорт и де ново синтез ряда аминокислот. Нарушенный метаболизм аминокислот приводит к замедленному синтезу белка и как следствие – к сниженной пролиферации и гибели клеток. Полученные данные согласуются с фенотипом нокаутных эмбрионов, которые демонстрируют отсутствие роста после имплантации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 23-75-10096).

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ
ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ОТ ПАЦИЕНТА С СИНДРОМОМ СИНГЛТОНА-
МЕРТЕНА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ
КАЛЬЦИФИКАЦИИ**

**Беляева А.А.^{1*}, Перепелина К.И.^{1,2}, Кузнецова Е.А.¹, Смирнова
Д.В.¹, Костарева А.А.², Васичкина Е.С.², Переплетчикова Д.А.¹,
Малашичева А.Б.^{1,2}**

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Национальный медицинский исследовательский центр им.*

В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: anna.myruleva.a@gmail.com*

Синдром Синглтона-Мертена редкое орфанное заболевание, причиной которого является мутация в гене *DDX58*. Ген кодирует белок, относящийся к группе RIG-1-подобных рецепторов. Белок представляет собой внутриклеточный рецептор, принимающий участие в распознавании вирусной РНК в клетке и запуске иммунного ответа. Характерными проявлениями синдрома являются патологии в развитии кровеносной системы, зубов и патологическая кальцификация органов, развитие раннего остеопороза. Механизмы, которые участвуют в патологической кальцификации, возникающей при синдроме Синглтона-Мертена, остаются, остаются неизвестны.

Целью работы явилось получение линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), несущих мутацию в гене *DDX 58* для создания модели для изучения патологической кальцификации.

В ходе работы из мононуклеарных клеток периферической крови пациента с синдромом Синглтона-Мертена при репрограммировании были получены две постоянных линии иПСК: SMS-DDX58_1 и SMS-DDX58_2. Обе линии экспрессируют маркеры плюрипотентности Sox2, Nanog, Oct4. Линии SMS-DDX58_1 и SMS-DDX58_2 способны дифференцироваться в сторону трех зародышевых листков. Секвенирование ДНК

полученных линий иПСК выявило наличие специфичной для пациента мутации в 7 экзоне гена *DDX58*, представляющей собой нуклеотидную замену с.902C>G в гетерозиготном состоянии, приводящий к аминокислотной замене р.Р301R. Идентичность иПСК была подтверждена с помощью STR-анализа. Полученные пациент-специфичные линии иПСК могут быть использованы для изучения молекулярных механизмов патологической кальцификации и определения ключевых участников этого процесса.

Работа выполнена при поддержке НЦМУ «Центр персонализированной медицины».

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ КОМПОЗИТНЫХ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

**Богданова Д.Н.^{1,2*}, Чабина А.С.¹, Нащекин А.В.³,
Нащекина Ю.А.¹**

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

³ *Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: dashbogd@gmail.com*

В настоящее время синтетические полимеры активно используются для нужд тканевой инженерии благодаря их физико-химическим свойствам. Один из них – поли-ε-капролактон (ПКЛ), большие размеры молекул которого и их линейно-разветвленная структура позволяют создавать пластичные и механически прочные конструкции. Из-за гидрофобности, отсутствия сайтов связывания и поверхностного заряда, затрудняющих адгезию клеток, в тканевой инженерии ПКЛ используется в основном в сочетании с другими веществами для повышения его биосовместимости.

Возможный способ модификации ПКЛ – добавление полиэтиленгликоля (ПЭГ) как источника гидроксильных групп.

Однако, ввиду разнообразия молекулярной массы ПЭГ, необходимо изучить ее влияние на свойства ПКЛ и на культивирование клеток, что и стало целью нашей работы.

Композитные пленки получали путем физического смешивания ПКЛ с ПЭГ различной молекулярной массы (1, 2, 4, 6, 8, 15 кДа) в массовом соотношении 70% и 30% соответственно. Пленки формировали, варьируя объем нанесения раствора, а затем инкубировали в воде в течение суток для вымывания фазы ПЭГ, что придавало пленкам развитую топологию.

Спектрофотометрическим методом оценивали выход ПЭГ, который был наибольший при молекулярной массе 1 и 4 кДа, наименьший – при 15кДа. Затем методом сидячей капли установили, что наиболее гидрофильные пленки содержат ПЭГ с молекулярной массой 6 кДа. Топологию поверхности пленок анализировали с помощью поляризационного микроскопа Nikon Eclipse LV1 и программы ImageJ. Отметим, что на вид и количество лунок и пор влияют молекулярная масса ПЭГ и объем раствора при формировании пленок. С помощью разрывной машины Shimadzu AGS-100kNXD оценивали их механические характеристики, которые ухудшались после вымывания ПЭГ.

Влияние композитных пленок на адгезию и пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток проводили с помощью окрашивания генцианвиолетом через 1 и 3 суток культивирования, которой в большей степени способствует модификация ПЭГ 6 и 8 кДа.

Таким образом, добавление ПЭГ к ПКЛ пленкам способствует улучшению биосовместимости композитных пленок.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-74-20120).

ВЛИЯНИЕ ОРИЕНТАЦИИ ФИБРИЛЛ КОЛЛАГЕНА НА ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОК

Вырезкова Е.В.^{1*}, Нащекин А.В.², Марков Д.П.², Чабина А.С.¹,
Нащекина Ю.А.¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе РАН,
Санкт-Петербург, Россия

E-mail*: kate_vy@mail.ru

Специалисты в области тканевой инженерии стремятся к созданию конструкций, полностью имитирующих человеческий внеклеточный матрикс, а коллаген, являясь его основной частью, — наиболее подходящий полимер для этой цели. Данный биополимер нетоксичен, биоактивен и биоразлагаем, что весьма привлекательно для применения в регенерации тканей и органов. Во многих тканях человеческого организма коллаген присутствует в ориентированном состоянии, поэтому при создании *in vitro* тканеинженерных конструкций на его основе важно сформировать подобную нативную структуру. Целью исследования является формирование параллельно ориентированных коллагеновых матриц, предназначенных для культивирования клеток.

В работе использовали коллаген I типа, выделенный из сухожилий крысиных хвостов путем уксуснокислой экстракции. Для визуализации ориентирования белок связывали с флуоресцентной меткой AF568, химическое связывание с которой подтверждали с помощью спектрометрии и ИК-спектроскопии. Методом сканирующей электронной микроскопии произведена оценка образования нативной фибриллярной структуры коллагена после связывания с флуорофором. С помощью МТТ-теста продемонстрировано, что наличие метки лишь незначительно снижает жизнеспособность клеток FetMSC на образцах.

Флуоресцентно меченый коллаген ориентировали в электрическом поле при разном времени воздействия (0,5, 1, 4, 8, 12 мин). С помощью метода конфокальной микроскопии продемонстрировано, что уже в первые минуты воздействия электрического тока

молекулы коллагена приобретают направленное движение. На начальном этапе белковые фрагменты расположены хаотично, но с увеличением времени ориентирования наблюдается образование параллельно ориентированных агрегатов белка.

С помощью системы CQ1 (Yokogawa) исследовано влияние времени ориентирования коллагена на адгезию и миграцию клеточной линии FetMSC. Продемонстрировано, что на ориентированных волокнах клетки передвигаются быстрее, чем на неориентированных.

Полученные волокна могут быть использованы в качестве матриц для ускорения регенерации поврежденных тканей за счет движения клеток от периферии к центру.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-74-20120).

РАЗРАБОТКА ДОКСИЦИКЛИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ IN VITRO МОДЕЛИ ПЛЕВРОДЕЗА

**Гайфуллина Л.М.^{1*}, Бакаленко Н.В.¹, Смирнова Д. С.¹,
Атюков М.А.², Малашичева А.Б.¹**

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Городская многопрофильная больница №2,*

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: lianagaiullina.va@yandex.ru*

Важной задачей торакальной медицины является лечение и профилактика первичного спонтанного пневмоторакса (ПСП), при котором воздух из легкого попадает в плевральную полость из-за нарушения целостности висцеральной плевры. Известно, что плевродез является самым эффективным методом лечения ПСП, в результате которого образуются спайки между висцеральной и париетальной плеврой. В этом процессе участвуют плевральные мезотелиальные клетки и фибробласты. Мезотелий реагирует на внешние сигналы и выделяет провоспалительные и профибротические факторы, которые активируют фибробласты для образования спаек. Иногда спайки не образуются и возможен рецидив ПСП. Данных о причинах рецидивов ПСП почти нет. Для

изучения факторов, препятствующих нормальному фиброгенезу, необходима клеточная модель плевродеза. В данной работе предложена подобная модель, разработанная на основе исследования Mierzejewski (Mierzejewski et al., 2022).

В исследовании мезотелиальные клетки выделяли из биоптата висцеральной плевры доноров с ПСП. Для индукции плевродеза к клеткам добавляли доксициклин (2 мкг/мл) и инкубировали 4 и 24 часа, затем меняли среду и инкубировали еще сутки. Среду с провоспалительными факторами добавляли к легочным фибробластам и инкубировали 24 часа. На мезотелиальных клетках были воспроизведены три этапа плевродеза, и методом количественной ПЦР показана экспрессия основных медиаторов: воспаление (IL-8, TGFβ1), коагуляция (PAI-1), фиброгенез (FGF2, MMP2, TIMP2). Более того, в легочных фибробластах фиксировали рост экспрессии профибротических факторов (ACTA2, COL1A1, SLUG and SNAIL).

Таким образом, предложенная *in vitro* модель плевродеза может быть использована далее для изучения механизмов плевродеза, ПСП и его рецидивов. В частности, согласно полученным данным более целесообразно воздействовать на мезотелиальные клетки 24ч.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021).

СИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХОНДРОЦИТОВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Голубинская П.А.^{1*}, Пикина А.С.¹, Ручко Е.С.^{1,2}, Еремеев А.В.^{1,2}

¹ *Федеральный научно-клинический центр физико-химической
медицины им. академика Ю. М. Лопухина Федерального
медико-биологического агентства России, Москва, Россия*

² *Институт Биологии Развития РАН, Москва, Россия*

E-mail: polinapigeon@gmail.com*

Клеточные продукты на основе аутологичных хондроцитов для терапии повреждений хрящевой ткани в настоящее время применяются в клинической практике. Однако подобные препараты

эффективны при небольшом поражении суставного хряща. Кроме того, при длительном воспалении невозможно получить достаточное количество клеток с высоким синтетическим потенциалом для создания полноценного имплантата. Хондроциты, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), проявляют ювенильный фенотип с высокой скоростью синтеза внеклеточного матрикса (ВКМ), что потенциально повышает эффективность имплантата на основе производных ИПСК в терапии хряща (Wu C.L., 2021). Однако к настоящему моменту недостаточно данных о синтезе ВКМ хондроцитоподобными производными ИПСК.

Транскриптомные и протеомные профили были получены и проанализированы для клеточных 2D и 3D культур хондроцитов, выделенных из биоптатов хрящевой ткани больных артритом и здоровых доноров, а также для 2D и 3D культур ИПСК и хондрогенных производных ИПСК. Оценка содержания гликозаминогликанов (ГАГ) в указанных культурах проводилась методом ИФА.

По результатам ИФА наиболее высокие концентрации ГАГ обнаружены в образцах 3D структур из хондроцитов пациентов. По данным протеомного анализа основные отличия выявлены между культурами хондроцитов пациентов и дифференцированных производных ИПСК. При этом повышенную экспрессию основных протеогликанов – агрекана, декорина, бигликана и хондроитинсульфата – показали образцы хондросфер из хондроцитов доноров. При сравнении 2D-культур хондроцитов от здоровых и больных доноров была выявлена up-регуляция генов, ассоциированных с синтезом и организацией ВКМ. Для сфероидов из хондроцитов пациентов, в отличие от сфероидов из производных ИПСК, характерна повышенная экспрессия генов, вовлеченных в формирование ВКМ и метаболизм ГАГ. Как и при сравнении сфероидов, в хондроцитах от пациентов была выявлена повышенная экспрессия генов, отвечающих за метаболизм и организацию внеклеточных структур.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-15-00250).

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ДИНАМИКИ
ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RUNX2 В УСЛОВИЯХ
ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК И
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С СИГНАЛЬНЫМ ПУТЕМ NOTCH**

Громова Е.С.^{1*}, Карелкин В.В.^{1*}, Малашичева А.Б.^{1*}

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский Государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

³ *Научно-исследовательский институт травматологии и
ортопедии им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: kate.gromova01@mail.ru*

Транскрипционный фактор Runx2 является ключевым регулятором остеогенной дифференцировки и играет важную роль в развитии скелета. Этот фактор взаимодействует с различными сигнальными путями, включая Notch-сигнальный путь. Целью работы является изучить механизмы регуляции Runx2, динамику активации в ходе остеогенной дифференцировки и взаимосвязь с генами-остеомаркерами и сигнальным путём Notch, так как это остается неясным.

Изучение динамики Runx2 в ходе остеогенной дифференцировки проводили на разных временных сроках с применением или без ингибитора протеасомной деградации MG132 с помощью вестерн-блоттинга, ПЦР в реальном времени, окрашивания ализариновым красным, а также люциферазного анализ промоторной активности. Эксперименты проводили на первичных культурах клеток человека: остеобластах и гингивальных фибробластах.

Исследование изменений уровня транскрипционного фактора Runx2 в ходе процесса дифференцировки остеобластов выявило уменьшение выработки белка в процессе дифференцировки. Люциферазный анализ подтвердил снижение активности промотора RUNX2 в процессе остеобластогенеза. Стабильная концентрации Runx2 в остеобластах и гингивальных фибробластах значительно повысила уровень мРНК гена HEY – мишени сигнального пути Notch, при индукции остеогенной дифференцировки. Так же резкий

подъём экспрессии гена HEY наблюдался уже при шести часах после индукции остеодифференцировки остеобластах.

По полученным данным можно сделать вывод, что для запуска процесса остеогенной дифференцировки в остеобластах необходимо снижение начального уровня белка Runx2 для запуска генов-мишеней, что приводит к уменьшению активности гена. Возможно, уменьшение активности на уровне транскриптов и белка является сигналом для предшественников остеобластов к завершению пролиферации и формированию дифференцировочного паттерна, а постоянный уровень белка Runx2 поддерживает активацию сигнального пути Notch.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ проекта 23-15-00320).

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СРЕД НЕРЕС и 199 В СОСТАВЕ КОЛЛАГЕНОВОГО ГЕЛЯ С ФИТИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Гурьянов Е.И. *, Чабина А.С., Нащеккина Ю.А.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: Murlok2000@mail.ru*

Коллагеновые гели активно используются в тканевой инженерии. Однако они обладают низкой жесткостью, которую повышают с помощью сшивающих агентов. Ранее нами было доказано, что фитиновая кислота имеет сшивающий эффект и изменяет физические параметры коллагеновых гелей на основе 199 среды. Но состав данной среды содержит аминокислоты и витамины, что не позволяет массово использовать в медицине препараты с её содержанием.

В качестве альтернативы был выбран буферный раствор на основе НЕРЕС (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), так как в его состав не входят биологически активные вещества, также в литературе утверждается, что данная среда хорошо подходит для фибриллообразования коллагена. Таким образом, цель данного исследования: изучить взаимодействие НЕРЕС и фитиновой

кислот в составе коллагенового геля, и оценить влияние их на клетки человека, для определения возможности заменить 199 среду на HEPES в составе коллагенового геля.

Для анализа взаимодействия фитиновой кислоты с коллагеновыми гелями на основе HEPES была использована УФ-спектроскопия, которая показала, что фитиновая кислота в присутствии HEPES не проявляет свои сшивающие свойства в отличие от 199 среды.

Влияние добавления HEPES и фитиновой кислоты, в коллагеновые гели, на клетки оценивали путем прижизненного анализа при помощи микроскопии мезенхимальных стромальных клеток человека (МСК). Клетки окрашивали красителем Hoechst. Съёмку производили на аппарате CQ1 Yokogawa в течении 24ч. Анализ подвижности клеток показал, что использование гелей на основе HEPES неблагоприятно влияют на подвижность клеток. Также стоит заметить, что содержание большой концентрации фитиновой кислоты в геле усиливает негативный эффект на жизнеспособность клеток, данный результат мы можем видеть на образцах с концентрацией фитиновой кислоты равной 3 мкл/мл и 4 мкл/мл. Однако, при малом добавлении фитиновой кислоты в гели, 1,5 мкл/мл. – наблюдается увеличение средней скорости клеток, в сравнении с большими концентрациями фитиновой кислоты

По результатам исследования можно сделать вывод, что использовать HEPES, в качестве замены 199 среды при сшивании коллагена фитиновой кислотой, не является возможным.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФ (проект № 21-74-20120).

**АНГИОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СЕКРЕТОМА ПРИ
ВЗАИМОДЕЙСТВИИ МСК И ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК
IN VITRO ЗАВИСИТ ОТ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ
КОММУНИКАЦИИ ЧЕРЕЗ ЩЕЛЕВЫЕ КОНТАКТЫ**

Ездакова М.И. *, Лобанова М.В.

*Государственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем РАН,
Москва, Россия*

E-mail: ezdakova.mi@gmail.com*

Взаимодействие между мезенхимальными стромальными клетками (МСК) и эндотелиальными клетками (ЭК) играет ключевую роль в формировании и поддержании сосудистой сети в организме. Щелевые контакты (ЩК) являются высокоспециализированными, обеспечивая перемещение вторичных мессенджеров, аминокислот, ионов кальция, глюкозы и ее метаболитов, микроРНК и др. непосредственно из клетки в клетку, минуя внеклеточное пространство. Участвуют в регуляции пролиферации, миграции, дифференцировки различных типов клеток, в том числе МСК и ЭК, обеспечивая поддержание тканевого гомеостаза.

В настоящей работе, мы проанализировали, как блокирование ЩК влияет на ангиогенную активность секретомата гетерокультуры МСК-ЭК. В работе использовали линейные МСК (ASC52telo - ATCC® SCRC-4000™) и ЭК (EA.hy926 - ATCC® CRL-2922™). Для блокирования ЩК использовали специфический ингибитор карбенексолон (100μM). Сокультивирование МСК и ЭК (1:2) проводили в течение 24 часов, при 20% O₂. Ненаправленную миграцию оценивали *in vitro* с помощью экспериментальной модели «рана». Содержание паракринных медиаторов в образцах кондиционированной среды (КС) определяли с помощью MILLIPLEX MAP (Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Premixed 41 Plex - Immunology Multiplex Assay) (Merck, Germany). Оценку ангиогенной активности КС проводили с использованием *in vitro* (Матригель) и *in ovo* (формирование сосудистой сети в хориоаллантаоисной оболочке (ХАО) эмбриона японского перепела (*Coturnix coturnix japonica*)) моделей.

Ингибирование ЦК приводило к снижению в КС уровня основных ангиогенных медиаторов, таких как VEGF-A, FGF-2, MCP-1. Что, по-видимому, являлось причиной ослабления эффекта КС на миграционную активность ЭК, формирование эндотелиоцитами тубулярных структур на Матригеле и рост сосудистой сети в ХАО *in ovo*. Таким образом, нарушение прямой межклеточной коммуникации при ингибировании ЦК может существенно снижать ангиогенный потенциал секрета при взаимодействии МСК и ЭК *in vitro*. Это в свою очередь может негативно сказаться на способности МСК и ЭК взаимодействовать и совместно формировать сосудистую сеть, что является ключевым аспектом физиологического и репаративного ангиогенеза.

Работы выполнены при финансовой поддержке РФФ (проект № 24-25-00231).

**СИНХРОНИЗАЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА
И ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
И КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ**

Ерофеева Е.Д.^{1,2*}, Абдыев В.К.²

¹ *Московский государственный университет им. М.В.*

Ломоносова, Москва, Россия

² *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,*

Москва, Россия

E-mail: erofeeva.zhenya@gmail.com*

Эмбриональные стволовые клетки мыши (мЭСК) – плюрипотентные стволовые клетки, которые получают из преимплантационных бластоцист E3.5-E4.5 эмбрионов (Najm et al., 2011). Эти клетки обладают свойствами наивной плюрипотентности, непрерывного самообновления и клоногенности (Davidson et al., 2015). Условия с двумя ингибиторами (2i/LIF) – ингибитором MEK/ERK и ингибитором GSK3b-киназы – поддерживают наивное состояние плюрипотентности без добавления экзогенных факторов.

Единичные мЭСК в 2i/LIF с высокой степенью образуют химеры после подсадки в бластоцисту реципиента и характеризуются высокой клоногенностью (Martin Gonzalez et al., 2016). В условиях 2i/LIF мЭСК, лишенные E-кадгерина и, как следствие, межклеточных контактов, поддерживают самообновление и клоногенность (Ying et al., 2008).

Целью нашего исследования было синхронизировать клеточный цикл наивных мЭСК в условиях 2i/LIF на матригеле и охарактеризовать экспрессию маркеров плюрипотентности, дифференцировки, фокальной адгезии, межклеточных контактов в течение клеточного цикла.

Мы выбрали оптимальные условия воздействия гидроксимочевины на мЭСК для синхронизации клеточного цикла. Мы показали, что воздействие гидроксимочевины в течение 12 часов приводит к синхронизации популяции на G1-фазе клеточного цикла, при этом клетки сохраняют наивное состояние плюрипотентности. Мы провели запуск клеточного цикла мЭСК и показали, что при переходе мЭСК с G1- на S-фазу и в S-фазе клеточного цикла повышается экспрессия маркеров плюрипотентности *Nanog*, *Klf2*, маркера фокальной адгезии *Vinculin*, ламининов *Lamc1*, *Lama5*. Данный подход синхронизации может быть моделью для исследования клеточного цикла в мЭСК.

ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЮЧЕВЫХ АМИНОКИСЛОТ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА OGT4, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИЮ SOX2- OGT4 В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ

Зиновьева А.С.* , Томилин А.Н., Бахмет Е.И.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: a.zinoveva@incras.ru*

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) отличаются способностью к самообновлению и к дифференцировке в любой тип соматических клеток, а также в половые клетки. Одним из ключевых маркеров ПСК

является транскрипционный фактор Oct4, представитель 5 класса семейства POU-доменных белков (POU5). В ПСК Oct4 выполняет свои функции в кооперации с транскрипционным фактором Sox2, представителем SoxB-класса. Гетеродимеризация с белками SoxB-класса *in vivo* является отличительной характеристикой белков POU5, тогда как POU-доменные белки остальных классов склонны образовывать гомодимеры. Определенный уровень Oct4 необходим для поддержания недифференцированного состояния эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), а гетеродимеризация Sox2-Oct4 является обязательным условием индукции плюрипотентности в соматических клетках.

При сравнении аминокислотных последовательностей POU-доменных белков мы заметили, что у представителей POU5-класса в зоне контакта с SoxB-белками отличительными аминокислотами являются Лейцин-16, Лизин-19 и Треонин-22 (L16, K19, T22), в то время как у других классов POU-доменных белков, как правило, в этих позициях находятся Фенилаланин-16, Аргинин-19 и Лизин-22 (F16, R19, K22). Мы предположили, что замены L16F, K19R, T22K могут повлиять на предпочтение Oct4 образовывать гетеродимеры с Sox2 и, как следствие, лишить его способности поддерживать и индуцировать плюрипотентность.

По результатам исследования, мутированный Oct4 с одиночными заменами L16F, K19R, T22K и их комбинациями способен поддерживать ЭСК в недифференцированном состоянии после условного нокаута эндогенного Oct4. В составе репрограммирующей кассеты OSKM мутированный Oct4 способен индуцировать плюрипотентность в эмбриональных фибробластах мыши с различной эффективностью.

В фундаментальном аспекте, выявление ключевых аминокислот, обеспечивающих взаимодействие Sox2-Oct4 *in vivo*, позволит определить механизмы, которые лежат в основе функционирования ПСК. Кроме того, понимание этих принципов позволит эффективнее использовать ПСК в регенеративной медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 23-75-10096).

КЛЕТОЧНЫЕ СФЕРОИДЫ ИЗ КЕРАТИНОЦИТОВ И ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА КАК БИОЛОГИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

Кардош А.В.^{1*}, Бикмулина П.Ю.¹, Ревокатова Д.П.¹, Ефремов
Ю.М.¹, Кошелева Н.В.¹, Шпичка А.И.^{1,3}, Тимашев П.С.^{1,2,3}

¹ Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Институт
регенеративной медицины, Москва, Россия

² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Центр
"Цифрового биодизайна и персонализированного
здравоохранения", Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В.
Ломоносова, Москва, Россия

E-mail*: kardosh_a_v@staff.sechenov.ru

Трехмерные модели кожи – распространенный инструмент биомедицинских исследований. Они позволяют воссоздать структуру и клеточный состав органа в условиях *in vitro*, однако методы их создания трудоемки и длительны. В данной работе были получены и исследованы сфероиды из кератиноцитов и фибробластов при различных условиях формирования. Такие мультиклеточные сфероиды могут стать удобной и простой в получении альтернативой существующим моделям кожи.

В работе изучали четыре группы сфероидов: две из них были получены либо из кератиноцитов, либо из фибробластов линий HaCaT и 977hTERT соответственно (моносфероиды), а другие две – сразу из двух данных типов клеток двумя разными способами (гетеросфероиды). Были исследованы различные биологические свойства сфероидов, включая динамику изменения их диаметров, морфологию, способность к переходу в монослой при помещении в адгезивные условия, биомеханические свойства, локализацию и содержание маркерных белков, степень дифференцированности кератиноцитов в гетеросфероидах.

По результатам работы было сделано несколько заключений. Во-первых, в гетеросфероидах клетки поддерживают более физиологичное состояние, чем в моносфероидах, поэтому для получения релевантной тканевой модели на основе клеточных сфероидов следует использовать как минимум два типа клеток. Во-вторых, гетеросфероиды, образованные путем наслаения кератиноцитов на ядро из фибробластов, имеют более явную дермально-эпидермальную архитектуру и более дифференцированный статус кератиноцитов в составе, в связи с чем могут применяться в качестве простейших моделей кожи *in vitro*. Наконец, гетеросфероиды, сформированные путем смешения кератиноцитов и фибробластов, более применимы для фундаментального изучения взаимодействий клеток и их самоорганизации в структуре сфероида.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 23-25-00503).

**СЕКРЕТОМ ОПИСТОРХИД В КАЧЕСТВЕ НОВОГО
ПОДХОДА К КОРРЕКЦИИ ХРОНИЧЕСКИ
НЕЗАЖИВАЮЩИХ РАН НА МОДЕЛИ САХАРНОГО
ДИАБЕТА 2 ТИПА**

Ковнер А.В. *, Запарина О.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Новосибирск, Россия

E-mail: anya.kovner@gmail.com*

Хронически незаживающие раны являются одним из основных осложнений сахарного диабета 2 типа. В настоящее время коррекция таких ран крайне затруднена, что диктует поиск новых терапевтических подходов. Биологически активные вещества секрета трематоды *Opisthorchis felineus* способны уменьшать острое воспаление, стимулировать ангиогенез, способствуют восстановлению поврежденного эпителия и ремоделированию внеклеточного матрикса печени. Цель исследования: изучение ранозаживляющих свойств экскреторно-секреторного продукта *O.*

felineus (ЭСП) на мышах линии db/db (модель сахарного диабета 2 типа).

Эксперимент был проведен на мышах-самцах линии B.K.S.Cg Dock7 $\langle m \rangle^{+}/+Lep^r \langle db \rangle/J$ (db/db) (модель сахарного диабета 2 типа), которым наносили поверхностные раны (d=5мм) и разделяли на: неспецифический контроль (метилцеллюлоза), специфический контроль (PDGF (бекаплермин) активное вещество мази Regnarex, одобренной для терапии диабетических язв в США и ряда стран Европы) и опытная группа (ЭСП). Забор образцов кожи для гистологического и ПЦР-РВ анализа производился на 4, 10 и 14 сутки.

Комплексное исследование показало, что обработка ран ЭСП способствовала: (1) снижению площади раны, отсутствию влажной корки и смыканию эпителиальных валиков; (2) снижению уровня площади воспаления и уровня экспрессии генов, ассоциированных с воспалением (*Arg1*, *Nos2*); (3) снижению экспрессии с *Vegfa* и количества молодых CD34⁺ сосудов на 14 сутки эксперимента; (4) снижению экспрессии генов, ассоциированных с ремоделированием внеклеточного матрикса (*Tgfb1*, *Mmp2*, *Acta2*, *Colla*), что может свидетельствовать о завершении процессов организации ВКМ. Следует отметить, что полученные результаты были сопоставимы с группой PDGF, достоверно отличаясь от группы метилцеллюлозы. Таким образом мы впервые продемонстрировали, что секретом *O. felineus* обладает ранозаживляющими свойствами на модели сахарного диабета 2 типа. Также мы использовали модель многократного нанесения для приближения к схемам лечения у человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 24-25-00082).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НОРМАЛЬНЫХ И РУБЦОВЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

**Колесниченко Ю.В.^{1*}, Хотин М.Г.¹, Кригер Д.В.¹, Оганесян
Е.А.², Михайлова Н.А.¹, Репкин Е.А.³, Юдинцева Н.М.^{1,2}**

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Национальный Медицинский Исследовательский Центр им.
В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Санкт-Петербургский государственный университет,
Научный парк, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: koles209@mail.ru*

Процесс восстановления поврежденной кожи является сложным, а при глубоких и обширных повреждениях заканчивается формированием рубца. Основными клетками, создающими структурную основу для формирования кожи при регенерации после повреждения, являются фибробласты. Несмотря на многочисленные исследования, актуальной задачей по-прежнему остается изучение механизмов образования рубцов и участия в нем фибробластов, а также разработка подходов, влияющих на процессы восстановления поврежденной кожи.

Целью исследования являлась оценка функциональных свойств фибробластов, выделенных из фрагментов нормальной кожи ДФ(Н) и кожи гипертрофического рубца ДФ(Р), полученных из разных областей кожи одного донора.

В работе оценивали фенотипический профиль, функциональную активность (клеточную подвижность, митохондриальную и лизосомальную активность), а также белковый состав секретомов ДФ(Н) и ДФ(Р). Использовали методы конфокальной микроскопии, проточной цитофлуорометрии, масс-спектрометрии. Анализ конфокальных изображений и треков движения клеток проводили в программе ImageJ, а движения единичных клеток в R. Статистический анализ выполняли в GraphPad Prism, значимые различия при $p < 0.05$.

Показано, что ДФ(Н) и ДФ(Р) обладали сходной морфологией и имели фенотипический профиль, характерный для МСК. Однако

клетки имели существенные различия в функциональной активности, а также в белковом составе секретома.

Таким образом, функциональные различия у фибробластов, полученных из разных областей кожи одного донора, выявленные при переводе клеток в культуру, могут свидетельствовать о сохранении тканеспецифичных свойств *in vitro* и о возможных изменениях функционирования клеток в процессе формирования рубца для поддержания его структуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашения № 075-15-2020-773 и 075-15-2021-1063).

СРАВНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОЧЕРНИЛ НА ОСНОВЕ ЖЕЛАТИНА ДЛЯ 3D- БИОПЕЧАТИ

Колпина Е.П. *, Дарвиш Д.М.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: lenorik12@yandex.ru*

Биопечать — это технология создания тканеинженерных конструкций посредством печати биоматериалами на 3D-принтере. Биоматериалы, используемые для печати, называют биочернилами. Такие чернила должны удовлетворять ряд требований: биосовместимость, заданную вязкость при печати, способность стабилизироваться (сшиваться) после того, как конструкция напечатана. Материал биочернил играет ключевую роль в технологии биопечати.

Желатин является наиболее часто используемым материалом для биочернил. Его комбинируют с различными веществами для получения стабильной 3D-конструкции. В данной работе было проведено сравнение нескольких рецептур биочернил на основе желатина. Желатин комбинировали с альгинатом, хитозаном, коллагеном и рибофлавином. У каждого из представленных веществ свой принцип сшивания: альгинат способствует сшиванию 3D-конструкции под действием двухвалентных ионов, хитозан сшивается при нейтральном pH, коллаген фибриллизуется при

нейтральном рН и создании физиологической ионной силы, а рибофлавин создаёт поперечные связи в желатине под действием ультрафиолета.

В данном исследовании были изучены стабилизирующие свойства биочернил на основе желатина различной концентрации (2,5%, 3,5% и 5%) с вышеуказанными сшивающими добавками. Нами были проанализированы консистенция и способность биочернил сохранять свои свойства после хранения.

Все исследуемые добавки продемонстрировали свою эффективность для стабилизации конструкции после печати. Наиболее стабильные результаты были получены в образцах с добавлением альгината натрия, однако напечатанные конструкции имели тенденцию сильно набухать при выдерживании в фосфатно-солевом буфере.

Было выявлено, что свойства биочернил существенно меняются после хранения в течение нескольких суток при температуре +4С. Наилучшие свойства сразу после приготовления продемонстрировали чернила на основе желатина 5%, а после хранения наилучшая консистенция была у чернил с концентрацией желатина 3.5%.

СИНТЕЗ DE NOVO ВНОСИТ ВКЛАД В МОДУЛЯЦИЮ УРОВНЯ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (РЭФР) ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭФР В СТВОЛОВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

**Котов М.А.^{1,2, *}, Каменцева Р.С.¹, Харченко М.В.¹,
Кошеверова В.В.¹, Корнилова Е.С.¹**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра

Великого, Институт биомедицинских систем и

биотехнологий, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: HappyMihalich@yandex.ru*

Считается, что высокий уровень экспрессии рецептора ЭФР в клетках связан с их трансформацией в злокачественные и является плохим прогнозом для пациентов. Ранее мы показали, что ряд МСК

человека, в том числе энМСК, экспрессируют рецепторный белок на уровне не меньшем, чем многие опухоли эпителиального происхождения, сохраняя при этом свойства нормальных клеток. При этом динамика деградации рЭФР в энМСК под действием ЭФР была замедлена по сравнению с канонической линией трансформированных клеток HeLa, а уровень рЭФР оставался низким в течение долгого времени.

Целью данной работы было оценить роль лизосомной деградации и синтеза *de novo* в регуляции количества рецептора ЭФР в энМСК и опухолевых клетках человека линии HeLa. Показано, что как в HeLa, так и в энМСК количество рецептора ЭФР при добавлении ЭФР уменьшается в 4 раза через сутки. В отличие от энМСК, в клетках HeLa происходит восстановление уровня рецептора ЭФР на пятые сутки.

Для оценки вклада синтеза *de novo* в уровень рецептора ЭФР этот процесс блокировали на двух уровнях: транскрипции и трансляции с помощью ингибиторов актиномицина Д и циклогексимида, соответственно. Снижение уровня рЭФР под действием актиномицина Д в HeLa показывает, что даже в отсутствие лиганда, оборот рЭФР в этих клетках довольно активный, чего нельзя сказать об энМСК.

В присутствии циклогексимида количество рЭФР также снижалось в 3-4 раза ко вторым суткам инкубации с ингибитором в обеих клеточных линиях, что свидетельствует о сравнимой интенсивности трансляции рецептора ЭФР. При этом восстановление уровня рецептора ЭФР при инкубации с ЭФР в обеих клеточных линиях блокируется циклогексимидом: стимуляция деградации рЭФР при действии лиганда в присутствии циклогексимида приводит к практически полному исчезновению рЭФР ко вторым суткам.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 23-14-00335).

**РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНЕ БЕТА-2-
АДРЕНЕРГИЧЕСКОГО РЕЦЕПТОРА В НАРУШЕНИИ
ОСТЕОДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПРИ ОСТЕОПОРОЗЕ**

**Краснова О.А.* , Ковалева А.А., Сопова Ю.В.,
Семенова П.И., Неганова И.Э.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: o.krasnova@incras.ru*

Ремоделирование костной ткани (КТ) представляет собой баланс между костной резорбцией и формированием КТ. Эти процессы обеспечивают поддержание адекватного действующей нагрузке объема КТ, способствуя сохранению ее прочности на протяжении всей жизни. Усиление резорбции и снижение эффективности формирования новой ткани приводит к развитию остеопороза.

Несмотря на то, что остеопороз мультифакторное заболевание, большинство случаев его развития генетически детерминировано. Известно, что рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCRs) важны для поддержания гомеостаза КТ. При этом показано, что мутации в генах GPCRs ассоциированы с развитием остеопороза. Однако, точные механизмы остаются малоизученными. Цель исследования состояла в выявлении механизма влияния на остеобластогенез (ключевого процесса формирования костной ткани) однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) rs1042713, rs33910799 и rs17778257 в гене *ADRB2*, кодирующем бета-2-адренергический рецептор.

Мы использовали количественную полимеразную цепную реакцию (qПЦР) для оценки экспрессии генов, белковый иммуноблот и иммунофлуоресцентный анализ (ИФ) для изучения уровня белков. Для оценки распределения клеток по клеточному циклу мы применили проточную цитометрию.

Мезенхимные стволовые клетки пациента с остеопорозом (oMCK) с SNPs в *ADRB2* демонстрировали сниженную экспрессию *ADRB2* на уровне мРНК и белка по сравнению с МСК от здорового донора (дМСК). Оценка экспрессии маркеров образования компонентов костного матрикса также показала, что oMCK неспособны к синтезу коллагена первого типа при индукции остеогенной дифференцировки

(ОД). Анализ активной формы про-пролиферативной киназы ERK выявил, что у оМСК при индукции ОД наблюдается увеличение ее экспрессии, что согласуется с данными проточной цитометрии, которые демонстрируют сохранение пролиферативной активности оМСК при индукции дифференцировки.

Полученные результаты впервые указывают на то, что оМСК с SNPs в гене *ADRB2* неспособны к эффективной ОД из-за сохранения пролиферативной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28/09/2021).

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ БЕЛКА NADS В РЕГУЛЯЦИИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

Куликова В.А.^{1*}, Кропотов А.В.¹, Антипова М.В.¹, Якимов А.П.^{1,2}, Нериновский К.Б.³, Никифоров А.А.¹

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: veronika.a.kulikova@gmail.com*

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) играет ключевую роль в клеточном метаболизме и сигналинге. Известно, что NAD-зависимые процессы участвуют в регуляции плюрипотентности и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток млекопитающих. Уровень внутриклеточного NAD регулируется путем его синтеза из амидированных (Nam и NR) и деамидированных (NA и NAR) производных витамина B3. Последним этапом синтеза NAD по деамидированному пути является реакция амидирования динуклеотида NAAD до NAD. Данную реакцию катализирует фермент NADS, мутации в гене которого приводят к нарушению раннего эмбриогенеза и появлению множественных пороков развития.

В данной работе мы показали, что в эмбриональных стволовых клетках мышцы (мЭСК) E14 в плюрипотентном состоянии (культивируемых в присутствии LIF) синтез NAD по амидированному пути (из NR) идет более эффективно, чем по деамидированному пути (из NAR). При дифференцировке мЭСК E14 с помощью ретиноевой кислоты (RA) эффективность биосинтеза NAD из NAR значительно возрастало. Более того, добавление NAR к мЭСК E14, находящимся в плюрипотентном состоянии, приводило к значительному накоплению в клетках NAAD, тогда как после дифференцировки накопление NAAD было гораздо менее выражено. Также мы продемонстрировали, что эффективность реакции амидирования NAAD до NAD *in vitro*, проводимой в экстрактах, полученных из плюрипотентных мЭСК E14, значительно ниже, чем в экстрактах дифференцированных клеток. На основании этих данных можно сделать вывод, что активность фермента Nads в мЭСК E14 повышается при переходе клеток из плюрипотентного в дифференцированное состояние. Таким образом, модуляция активности фермента Nads может играть важную роль при поддержании стволовых клеток в плюрипотентном состоянии и в процессе их дифференцировки. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-14-00319).

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ CDC42 И ROCK1 НА СТРУКТУРУ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА МСК В ПРОЦЕССЕ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ

Лукачева А.В.^{1,2*}, Мусорина А.С.¹, Полянская Г.Г.¹,

Бобков Д.Е.^{1,2}

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Национальный Медицинский Исследовательский Центр им.*

В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: av.lukacheva@yandex.ru*

МСК человека подвержены репликативному старению (РС), которое характеризуется снижением пролиферации, изменением

морфологии клетки, увеличенной активностью β -галактозидазы и изменением других характеристик клеточной линии. Изменение морфологии клетки зависит от организации актинового цитоскелета. Ключевыми регуляторами реорганизации актинового цитоскелета являются малые ГТФазы семейства Rho. Для изучения роли малых ГТФаз в регуляции цитоскелета МСК в процессе РС мы использовали ингибиторы Rho- и Cdc42-сигнальных путей. Y-27632 является ингибитором ROCK1 – даунстрим-эффектора RhoA, отвечающего за сборку стресс-фибрилл и образование фокальных контактов. ZCL 278 – ингибитор Cdc42 ГТФазы, контролирующей полярность клеток и образование филоподий.

Цель работы: исследовать влияние Y-27632 (в концентрации 10 мкМ) и ZCL278 (50 мкМ) на площадь, округлость и цитоскелет клеток линии MSCWJ-1 в процессе РС.

В работе использовали клетки MSCWJ-1, полученные и охарактеризованные в ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных” ИИЦ РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали с 6 по 29 пассаж. Для анализа морфологических изменений использовали следующие методы: визуализация F-актина с помощью родамин-фаллоидина, конфокальная микроскопия и анализ изображений. Для количественной оценки степени упорядоченности актинового цитоскелета для каждой отдельной клетки рассчитывали коэффициент локальной связанной фрактальной размерности (LCFD).

РС было подтверждено тестом на активность β -галактозидазы. Результаты исследования показали, что в процессе РС значительно увеличивается площадь клеток, при этом округлость MSCWJ-1 не изменяется. На всех изученных пассажах (9, 18, 29) добавление Y-27632 сопровождается значительным уменьшением LCFD относительно контрольных клеток. Значение LCFD в контроле не изменяется при РС. Добавление ZCL278 приводит к существенному снижению LCFD только на 29 пассаже.

Таким образом, Y-27632 влияет на организацию цитоскелета MSCWJ-1 на всем протяжении РС, а ZCL278 оказывает влияние

только на поздней стадии РС. Мы предполагаем, что РС MSCWJ-1 сопровождается увеличением экспрессии Cdc42.

**СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО
МАТРИКСА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ O₂**

Матвеева Д.К. *, Кочетова Э.С., Горностаева А.Н.

*Государственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем РАН, Москва,
Россия*

E-mail: matveeva.dajana@yandex.ru*

Внеклеточный матрикс (ВКМ) - продукт секреторной активности МСК, который вызывает интерес исследователей в связи с возможностью использования в качестве подложки для роста и дифференцировки клеток при создании тканевых конструкций. Свойства получаемого ВКМ зависят как от условий культивирования, так и тканевого источника МСК. Целью данной работы было оценить структурные свойства ВКМ, полученного от МСК из различных тканей при моделировании тканевого уровня O₂ в микроокружении.

МСК выделяли из жировой ткани (жтМСК) и ткани пупочного канатика человека (тпкМСК) и постоянно культивировали при 20 % или 5 % O₂. После 14 суток монослои децеллюляризировали (0,5% Triton-X100/20 mM NH₄OH), получая дцВКМ. Проводили оценку структуры и характера упаковки фибрилл с помощью голомографической микроскопии (TomoCube HT-X1, Южная Корея), микроскопии в светлом поле после окраски гистологическим красителем Sirius Red, а также определяли коэффициент жесткости дцВКМ с помощью атомно-силовой микроскопии (Solver Next, NT-MDT, Россия).

После децеллюляризации как жтМСК, так и тпкМСК выявлено сохранение густой сети коллагеновых белков (Sirius Red) в ВКМ вне зависимости от уровня O₂ в микроокружении. С помощью

голотомографии получены данные о характере упаковки фибрилл и толщине депонированного ВКМ. Вне зависимости от тканевого источника культивирование МСК при физиологической гипоксии сопровождалось выравниванием волокон ВКМ. Такие структурные изменения коррелировали с увеличением коэффициента жесткости жтМСК-дцВКМ при 5% O₂.

С помощью анализа голотомографических 3D изображений установлено, что при 5% O₂ у тпкМСК слой накапливаемого дцВКМ тоньше по сравнению с 20% O₂. Для жтМСК таких различий не установлено. Толщина слоя дцВКМ от тпкМСК при 20% O₂ в 2 раза больше по сравнению с дцВКМ от жтМСК и он сформирован несколькими слоями разнонаправленных волокон.

Таким образом, ответ жтМСК и тпкМСК на физиологическую гипоксию сопровождается изменением характера упаковки ВКМ. Такая направленная модификация может быть использована в протоколах тканевой инженерии. ТпкМСК могут быть более востребованными, поскольку обладают выраженной синтетической активностью в отношении ВКМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 23-15-00062).

ЭМБРИОНАЛЬНОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ СЕРТОЛИ-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК

Мун В.В.* , Малолина Е.А., Кулибин А.Ю.

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Москва, Россия*

E-mail: valeriy.vl.mun@yandex.ru*

Клетки Сертоли (КС) – ключевые для сперматогенеза млекопитающих соматические клетки. Они важны для разработки методик лечения мужского бесплодия, но поиск их высокопролиферативного аналога является актуальной задачей, т.к. пролиферация КС в культуре затруднена. Так, в нашей лаборатории была открыта популяция Сертоли-подобных клеток (СПК). Они обладают схожим с КС профилем экспрессии, активной

пролиферацией и локализуются в области сети семенника (СС) (Malolina, Kulibin, 2019). Мы предполагаем, что КС можно получить из СПК, но для этого необходимо понять механизмы их эмбрионального развития.

Целью работы является изучение эмбрионального развития области локализации Сертоли-подобных клеток - СС мыши.

Существуют косвенные доказательства происхождения клеток СС из КС (Кулибин, Малолина, 2021). Для экспериментального подтверждения мы получали химерные органоиды гонад на E12.5 - стадии, когда СС активно формируется. Половина органоида состояла из семенника без клеток СС. Другая половина - из мезонефроса без КС. Клетки “мезонефрической” части экспрессировали репортерный ген GFP. Культивировали органоиды в течении 3-х суток на агаровом блоке.

Для получения “семенной” части органоида из гонады, необходимо делать разрез, отступив 1/3 толщины семенника от границы гонада-мезонефрос, “мезонефрической” - по границе гонада-мезонефрос. 8/8 семенников не содержали Pax8+ клеток (маркер клеток СС), 6/6 мезонефросов - Amh+ клеток (маркер КС). После культивирования в 6/6 мезонефросов не формируются Amh+ клетки, а в 7/8 семенников - не формируются Pax8+ клетки.

При культивировании химерного органоида показано, что только в “семенной” части органоида, формируются Pax8+ клетки (5/6 образцов) и клетки с двойным фенотипом Amh+/Pax8+. Полученные результаты свидетельствуют в пользу частичного происхождения клеток СС из эмбриональных КС.

Мы обнаружили, что формирование Amh+/Pax8+ клеток происходит только в тех органоидах семенника, где уже присутствовали клетки СС. Эти результаты, вкупе с проведенным нами анализом межклеточных взаимодействий CellChat по данным scRNA-seq эмбриональных семенников, показал возможность взаимодействия между КС и клетками СС на соответствующих эмбриональных стадиях.

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2024 года (№ ГЗ 0088-2024-0012).

ВЛИЯНИЕ YAP-СИГНАЛИНГА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПРОГЕНИТОРНЫХ АЛЬВЕОЛОЦИТОВ В ОРГАНОИДАХ ЛЕГКИХ МЫШИ

**Новикова Ю.А.* , Говорова И.А., Никиточкина С.Ю.,
Сутягина О.И., Воротеляк Е.А.**

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Москва, Россия*

E-mail: yula1308@mail.ru*

Нippo сигнальный путь и его транскрипционный ко-фактор YAP играют важную роль в морфогенезе, поддержании гомеостаза, процессах регенерации и дифференцировке клеток в легких млекопитающих (Mahoney et al., 2014; van Soldt et al., 2020). Однако, до конца не изучен YAP-индуцированный механизм дифференцировки альвеолоцитов при модуляции Нippo пути. Известным ингибитором YAP в ядре клетки является вертепорфин (Liu-Chittenden et al., 2012), а условным активатором – ингибитор Lats-киназы TRULI (Kastan et al., 2021). Целью данной работы являлось исследование влияния химической активации и ингибирования YAP-сигналинга на дифференцировку альвеолоцитов в альвеолярных органоидах легких мыши.

Для получения альвеолярных органоидов клетки выделяли из легких мышцей P30 линии C57Bl/6 согласно стандартному протоколу (Sinha et al., 2016). С помощью MACS удаляли лейкоциты (CD45+) и эндотелий (CD31+), путем FACS изолировали клетки мезенхимы (EpCAM-) и эпителия (EpCAM+Sca1-) – прогениторные альвеолярные клетки AT2 (Louie et al., 2022). Полученные клеточные фракции сочетали в соотношении 9:1 и культивировали в матрикеле (Corning) во вставках (Transwell) в течение 14 сут. Затем органоидам добавляли вертепорфин (ВТП, 1 мкМ) и TRULI (10 мкМ) на 5 сут.

ИЦХ анализ показал, что под воздействием TRULI увеличивается колоние-формирующий потенциал (CFE), пролиферация клеток, доля YAP+ клеток и снижается доля SFTPC+ (AT2) клеток. Под

воздействием ВТП снижается CFE, пролиферация, доля YAP+ клеток и незначительно увеличивается доля SFTRPC+ клеток.

Транскриптомный анализ органоидов показал, что под воздействием TRUL1 увеличиваются гены Hippo пути и AT1, а гены AT2 – снижаются. Под воздействием ВТП снижается экспрессия генов пути Hippo, однако гены AT1 и AT2 не имеют значимых различий с контролем.

Таким образом, снижение доли AT2 и экспрессии их генов при одновременном увеличении общего числа клеток свидетельствует о дифференцировке прогениторных AT2 в другие типы клеток в альвеолярных органоидах под воздействием активатора YAP-сигналинга TRUL1. Ингибитор YAP-сигналинга ВТП неоднозначно влияет на дифференцировку и требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-74-30015).

КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК С КЛЕТКАМИ МЕЗЕНХИМНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ

**Переpletчикова Д.А.^{1*}, Басович Л.С.^{1*}, Лобов А.А.^{1*},
Азаркина К.Е.¹, Кучур П.Д.¹, Хворова И.А.¹, Карелкин В.В.²,
Малашичева А.Б.¹**

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Научно-исследовательский институт травматологии и
ортопедии им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: dasha_perepletch@mail.ru*

Дифференцировка мезенхимных стволовых клеток (МСК) в остеогенном направлении представляет собой сложное и динамичное явление, протекающее по схожему образцу как в норме, так и при патологиях. Известно, что эндотелиальные клетки (ЭК) формируют микроокружение МСК и непосредственно участвуют в регуляции их дифференцировки. Поэтому изучение механизмов влияния ЭК на процессы остеогенной дифференцировки МСК

открывает большие перспективы понимания биологии костей и эктопической кальцификации.

Мы провели эксперименты по сокультивированию в условиях контактного и бесконтактного взаимодействия ЭК и клеток мезенхимного происхождения (остеобластов) при остеогенной индукции. Эффективность дифференцировки на начальных этапах оценивали по экспрессии остеогенных маркеров, терминальные стадии – по окраске ализариновым красным. Определили, что ЭК при различных условиях сокультивирования одновременно обладают остеоиндуктивными и остесупрессивными свойствами. Контактное – усиливает, а бесконтактное – подавляет остеогенную дифференцировку.

Далее провели протеотранскриптомный анализ. Выявили, что остесупрессивные свойства связаны с действием паракринных факторов, а остеоиндуктивные – опосредованы сигнальным путем Notch и реализуются только при наличии физического контакта. Методом РВ-ПЦР установили – при прямом сокультивировании увеличивается экспрессия: *NOTCH1*, *NOTCH3*, *JAG1* и *HEY1*. Далее изучили, как подавление компонентов сигнального пути Notch в ЭК влияет на кальцификацию. Для этого трансдуцировали ЭК одной из лентивирусных конструкций, несущих shRNA к генам Notch, затем сокультивировали модифицированные ЭК с остеобластами. Через 14 дней окрашивали ализариновым красным. Определили, что подавление *NOTCH1*, *NOTCH3* и *MAML1* оказывает ингибирующее действие на остеогенную дифференцировку остеобластов, совместно культивированных с модифицированными ЭК.

Полученные данные определяют двойственную роль ЭК в модуляции остеогенной дифференцировки и показывают особую роль сигнального пути Notch при индукции остеогенной дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 23-15-00320).

МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА НА ОСНОВЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛИОРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Пикина А.С.* , Еремеев А.В.

*Федеральный научно-клинический центр физико-
химической медицины им. академика Ю. М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства России,
Москва, Россия*

Email: arina.pikina@yandex.ru*

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) играет решающую роль в поддержании гомеостаза центральной нервной системы, контролируя проникновение молекул из кровотока в ткань головного мозга. Для изучения барьерной функции ГЭБ и механизмов избирательного транспорта традиционно использовали перфузию сосудистой системы головного мозга животных, однако этот метод имеет ограничения, не отражая специфику ГЭБ человека (Raut et al., 2022). В связи с этим, разработка моделей ГЭБ человека *in vitro* представляется актуальным направлением, а наиболее многообещающими результатами среди других клеточных источников для моделирования обладают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК).

В нашем исследовании представлена биомиметическая модель ГЭБ человека *in vitro* с использованием дифференцированных производных ИПСК на платформе Transwell™. ИПСК обладают потенциалом для воспроизведения различных типов клеток, а система Transwell™ обеспечивает контролируемую среду для совместного культивирования нейральных и эндотелиальных клеток. Предложенная модель основана на принципах барьерогенеза *in vivo* (Eremeev et al., 2021, Pham, et al., 2018), при этом нейральные предшественники и эндотелиальные клетки находятся в непосредственном контакте друг с другом, что лучше отражает физиологические условия.

В результате, дифференцированные производные ИПСК экспрессировали характерные маркеры клеток ГЭБ, включая β3-

тубулин, CD31, CD105, белки плотных контактов клаудин-5, окклюдин, ZO-1 и транспортёры GLUT-1, LAT-1 и P-gp. Трансэндотелиальное сопротивление (TEER), показатель барьерной функции, достигло ~ 2000 Ом·см², что свидетельствует о высокой степени герметичности (Salmina et al., 2021). Совместные культуры демонстрировали низкую проницаемость для флуоресцентного декстрана (40 кДа) и митохондриального красителя (672 Да). Кроме того, модель позволяет исследовать влияние воспаления на функции ГЭБ посредством индукции цитокинами и оценки изменения проницаемости для моноклеаров крови и макрофагов. Оптимизация и масштабирование этой модели могут открыть возможности для стандартизированного изучения ГЭБ человека и разработки новых терапевтических стратегий для заболеваний, связанных с ГЭБ.

СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* В ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Поздняков Д.Ю.*, Дерябин П.И., Бородкина А.В.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: 9apdu179@gmail.com*

Традиционно индукцию экспрессии факторов OCT4, SOX2, KLF4, cMYC используют для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Однако, в последние годы кратковременную экспрессию этих же факторов плюрипотентности рассматривают как наиболее перспективную анти-aging терапию, направленную на обращение эпигенетического старения клеток.

В нашей недавней работе мы показали, что эпигенетическое старение эндометриальных стромальных клеток (эСК) является одной из причин возраст-ассоциированного снижения фертильности женщин. В этом контексте, частичное репрограммирование эСК может быть использовано для восстановления женской фертильности. Таким образом, целью данной работы являлось

создание системы для индуцибельной экспрессии факторов OCT4, SOX2, KLF4 и получение на ее основе линии генетически-модифицированных ЭСК.

Система индуцируемой экспрессии факторов плюрипотентности состоит из двух лентивирусных векторов и была получена путем молекулярного клонирования. Трансгены собирались в единую кассету методом overlap extension ПЦР и разграничивались 2-а-последовательностями для полицистронной экспрессии.

Для экспрессии факторов OSK первичная линия ЭСК была модифицирована данной системой векторов. Один из них содержал кассету генов *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, перед промотором которой содержалась регуляторная последовательность Tet-operator. Эта последовательность представляет собой сайт связывания белка-репрессора TetR, который кодировался вторым вектором. Такая система позволяла запускать экспрессию факторов плюрипотентности только при добавлении в питательную среду тетрациклина.

После индукции экспрессии факторов тетрациклином, было выявлено значимое увеличение содержания транскриптов трансгенов в клетках, которое снижалось после удаления тетрациклина. Было отмечено изменение морфологии ЭСК в ответ на индукцию экспрессии факторов, которая так же восстанавливалась в отсутствии тетрациклина. Клеточная специфичность, которая оценивалась по экспрессии ряда генов, не изменялась при коротких сроках индукции тетрациклином, в отличии от клеток, с длительной индукцией.

Таким образом нами получена система индуцибельной экспрессии факторов OSK и линия ЭСК, модифицированная данной системой.

**ИММОРТАЛИЗАЦИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ
МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
КАК ПОДХОД К СТАБИЛИЗАЦИИ СОСТАВА И
АКТИВНОСТИ ИХ СЕКРЕТОМА**

**Примак А.Л.^{1*}, Джауари С.С.¹, Басалова Н.А.², Кулебякина
М.А.², Волошин Н.С.¹, Виговский М.А.², Чечехина Е.С.¹,
Ефименко А.Ю.^{1,2}, Акопян Ж.А.^{1,2}, Ткачук В.А.^{1,2}, Карагяур
М.Н.^{1,2}**

*¹ Московский государственный университет им. М.В.
Ломоносова, Москва, Россия*

*² Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-
образовательный центр, Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
E-mail*: primak.msu@mail.ru*

Мультipotентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) считаются одним из ключевых регуляторов процессов обновления и регенерации тканей, причем эту свою функцию они преимущественно реализуют через продукцию широкого спектра биологически активных молекул: факторов роста, цитокинов, белков матрикса, микроРНК и др. Секретом МСК во многом может имитировать действие самих клеток и, как было показано в ряде недавних исследований, является перспективной композицией для лечения ряда патологий, в т.ч. и повреждений центральной нервной системы.

Первично выделенные культуры МСК обладают ограниченным пролиферативным потенциалом, быстро стареют и утрачивают свои свойства в культуре, что не позволяет использовать их в качестве стабильного источника для масштабированного получения секретома и является фундаментальным ограничением применения секретома МСК в клинической практике.

Ранее нами был создан ряд культур иммортализованных МСК (иМСК) жировой ткани человека посредством эктопической экспрессии теломеразы (Primak et al., *IJMS*, 2024). Полученные культуры иМСК обладали более высоким пролиферативным

потенциалом, замедленным клеточным старением и дольше сохраняли МСК-специфичный иммунофенотип по сравнению с культурами первичных МСК (пМСК).

Сравнительный анализ секретома иМСК и пМСК показал высокую стабильность состава секретома МСК после иммортализации и в ходе пассирования культур иМСК, а его биологическая активность была подтверждена в ряде *in vitro* и *in vivo* моделей. Накопленные данные позволяют предположить высокую перспективность применения культур иМСК для получения клинически значимых количеств секретома с целью разработки перспективных биомедицинских препаратов для регенеративной медицины.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект №19-75-30007).

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ ASC52telo НА ЭНДОТЕЛИОЦИТЫ ЛИНИИ EA.

hy926

Ратушный А.Ю.^{1*}, Матвеева Д.К.¹, Кондратьева Л.Г.²,

Ездакова М.И.¹

¹ *Государственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем РАН,*

Москва, Россия

² *Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия*

E-mail: ratushkin@mail.ru*

В настоящее время для экспериментов *in vitro* часто используют иммортализованные культуры клеток. К основным достоинствам подхода стоит отнести более высокую степень воспроизводимости результатов. В связи с этим изучение многих клеточных процессов с использованием стандартных иммортализованных культур получило широкое распространение. Более глубокое понимание физиологии модельных объектов и их взаимодействий позволит оптимальнее планировать эксперименты в соответствии с конкретными задачами.

Свои «бессмертные» аналоги имеют также мезенхимальные стволовые клетки (МСК) – ASC52telo (ATCC® SCRC-4000™) и эндотелиальные клетки (ЭК) – EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™). МСК выполняют регуляторную роль в тканях. Они занимают периваскулярную нишу и участвуют в ангиогенезе, иммуномодуляции и других процессах. МСК секретируют различные паракринные факторы, влияющие на функциональный статус ЭК, а также на сосудистую проницаемость.

Цель нашего исследования заключалась в изучении эффектов, которые оказывают МСК линии ASC52telo на ЭК линии EA.hy926 при прямом и паракринном взаимодействии.

ЭК подвергали прямому сокультивированию с МСК в соотношении 1:1, воздействию секретома МСК и культивированию на внеклеточном матриксе от МСК в течение 48 часов. Перед экспериментом линии оценивали на соответствие ряду характеристик первичных клеточных популяций, из которых они были получены. Изучали секреторную активность отдельных культур, при сокультивировании и при воздействии секретома МСК на ЭК. При взаимодействии с МСК в ЭК повышался уровень окислительного стресса, активность лизосомального компартментов, экспрессия отдельных молекул межклеточного взаимодействия. При помощи РНК секвенирования провели полный анализ транскриптома ЭК после экспериментальных воздействий.

В совокупности данные указывают на то, что иммортализованные линии имеют явно сходные характеристики с первичными клетками, хотя их специфику также необходимо учитывать. Отмечено, что прямое взаимодействие оказывает более выраженный эффект на ЭК, чем отдельное воздействие секретома.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 24-25-00231).

**ХОНДРОГЕННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ДЕРМАЛЬНЫХ
ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ
ИНЖЕНЕРИИ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЦА**

**Рахимов Б.Р.^{1*}, Марченко Д.М.¹, Божокин М.С.^{1,2},
Михайлова Е.Р.¹, Хотин М.Г.¹**

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Научно-исследовательский институт травматологии и
ортопедии им. Р.Р. Вредена,*

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: rah.bulat7@yandex.ru*

Гиалиновый хрящ (ГХ) представляет собой соединительную ткань, которая ввиду структурных особенностей обладает ограниченным потенциалом к восстановлению. Перспективным направлением лечения локальных дефектов хряща является применение биомедицинских продуктов, содержащих модифицированные клетки, что приводит к увеличенному синтезу белков внеклеточного матрикса и способствует образованию регенерата. В данной работе была проведена трансдукция дермальных фибробластов человека лентивирусными частицами, несущими последовательности генов *Tgfb3* и *Sox9*.

Клеточная культура дермальных фибробластов человека DF2 была получена из Центра коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН. Проводили трансфекцию клеточной культуры НЕК293Т для получения лентивирусных частиц, несущих гены интереса и зеленый флуоресцентный белок (GFP). Для подтверждения сборки лентивирусных частиц и определения оптимального титра вируса осуществляли тестовую трансдукцию НЕК293Т. Эффективность трансдукции дермальных фибробластов лентивирусными частицами оценивали с помощью фотографий с флуоресцентного микроскопа и проточной цитофлуориметрии на 5, 10 и 15 сутки. Клеточный лизат использовали для определения уровня экспрессии основных генов, ассоциированных с хондрогенезом (*Col2a1*, *Acan*, *Comp*, *Tgfb3*) в динамике при помощи РВ-ПЦР с FAM зондами. Содержание

гликозаминогликанов (ГАГ) подтверждали окрашиванием альциановым синим.

Процент трансдуцированных клеток для группы *Tgfb3*, согласно проточному цитофлуориметру, был от 23 до 41 %. Плаزمида *Sox9* не содержала участок GFP, поэтому для данной группы клеток невозможно было оценить количество трансдуцированных клеток посредством флуоресцентного микроскопа и проточного цитофлуориметра. Наблюдали значительное увеличение (в 10 раз и более) относительной экспрессии генов *Col2a1* и *Acan* в обеих экспериментальных группах на всех сроках культивирования. Окрашивание альциановым синим явно выявило увеличенное содержание ГАГ в экспериментальных группах в сравнении с контролем.

Полученные данные могут быть использованы при конструировании тканеинженерных конструкций для регенерации гиалинового хряща на основе дермальных фибробластов.

РАЗРАБОТКА БИОЧЕРНИЛ НА ОСНОВЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ И СФЕРОИДОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕЗАЖИВАЮЩИХ РАН

**Ревокатова Д.П.* , Бикмулина П.Ю., Кошелева Н.В., Файзуллин
А. Л., Христидис Я.И., Ершов Б.П., Шпичка А.И.,
Тимашев П.С.**

*Первый Московский государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова, Институт
регенеративной медицины, Москва, Россия
E-mail*: revokatova.d@gmail.com*

Незаживающие раны имеют широкое распространение и приводят к значительным финансовым затратам и снижению качества жизни. В качестве перспективного решения для терапии особое внимание уделяется созданию комбинированных биоэквивалентов на основе гидрогеля, клеточных сфероидов и внеклеточных везикул. В данной системе гидрогель обеспечивает механическую поддержку, сфероиды составляют клеточную основу, а внеклеточные везикулы

стимулируют восстановление благодаря высокому прорегенеративному и противовоспалительному потенциалу. Исследование было сосредоточено на двух типах внеклеточных везикул - экзосомах и матрикс-связанных везикулах (МСВ) из мезенхимных стромальных клеток (МСК). В качестве гидрогеля был выбран фибрин и желатин в связи с хорошо изученными свойствами и положительным влиянием на жизнеспособность клеток. Мы оптимизировали протокол выделения МСВ и с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и динамического светорассеяния подтвердили надежность нового метода. Анализ протеомного профиля выявил, что экзосомы, по сравнению с МСВ, содержат больше белков, в особенности ответственных за способность биоэквивалентов к васкуляризации и интеграции в окружающие ткани. Эксперименты *in vitro* показали, что экзосомы способствуют формированию более разветвленной сети отростков из сфероидов МСК, что косвенно может свидетельствовать о более высокой зрелости биоэквивалентов. Был разработан протокол создания комбинированных биочернил. На основании экспериментов *in vivo* было показано, что гидрогель, а также гидрогель со сфероидами МСК при подкожной имплантации у мышей не вызывает иммунного ответа и хорошо интегрируются в окружающие ткани. При этом добавление клеток заметно снижает местное воспаление.

Данное исследование представляет собой первый шаг на пути к созданию биоэквивалента для лечения незаживающих ран и в целом открывает новые подходы к созданию комбинированных биочернил. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-75-10120).

**ИЗУЧЕНИЕ ОНКОГЕННОСТИ, ТУМОРОГЕННОСТИ
И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА ТКАНЕВОЙ
ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ
ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ НА МЫШАХ ЛИНИЙ BALB/C NUDE
и C57BL/6**

Ручко Е.С.* , Пикина А.С., Голубинская П.А., Еремеев А.В.

*Федеральный научно-клинический центр физико-
химической медицины им. академика Ю. М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства России,
Москва, Россия*

E-mail: Ruchkoevgeny@yandex.ru*

Клеточные технологии являются одним из наиболее динамично развивающихся направлений медицины. Подходы, связанные с клеточной терапией, показали свою эффективность, в том числе и для восстановления хрящевой ткани. В зарубежной клинической практике, для лечения повреждений суставного хряща, успешно применяются технологии, основанные на аутологичных хондроцитах. Создание трёхмерных хрящеподобных конструкций открывает новые перспективы для коррекции объёмных дефектов суставного хряща. Однако, перед полноценным применением подобных технологий, необходимо убедиться в соответствии клеточного продукта установленным стандартам в вопросах о безопасности и эффективности его применения.

В рамках данной работы была создана партия хрящевого имплантата «Хондросфера» на основе хондроцитов человека. Исследования показали, что полученные клеточные культуры имеют схожий с нативными хондроцитами уровень экспрессии основных маркёров: агрекана, коллагена I и II типов и SOX9. Подобные выводы были получены с помощью иммуноцитохимического анализа и количественной полимеразной цепной реакции. Далее были проведены эксперименты по трансплантации хрящевых имплантов мышам линии Balb/c Nude, с разделением животных на три группы: «Контроль-плацебо» (n = 24), «Хондросферы» (n = 24) и «Клеточные линии МСК, MDA231» (n = 6). В результате было показано, что

хондросферы не проявляют онкогенности и туморогенности, не увеличиваются в размерах в живом организме и не мигрируют в отдалённые органы и ткани через 3 и 9 месяцев после введения по сравнению с МСК и MDA231. Кроме того, гистологическое исследование, подтвердило формирование гетеротипической хрящевой ткани в местах инокуляции хондросфер у подопытных животных. Аналогичные результаты, о стабильности интеграции трансплантатов в окружающие ткани, были получены и в экспериментах по инокуляции хондросфер мышам линии C57BL/6: “Контроль-плацебо” (n = 6), «Хондросферы» (n = 22), при анализе образцов ткани спустя 12 месяцев после трансплантации. В совокупности, приведенные данные подтверждают безопасность и эффективность исследуемого клеточного продукта. Работа выполнена в рамках государственного задания «Хондросфера-2» (№124031500116-4).

ПОЛУЧЕНИЕ ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ ЛИНИЙ ИЗ КУЛЬТУРЫ ПЕРВИЧНЫХ ГИНГИВАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

**Сафарова Д.Д.^{1*}, Смирнова Д.В.¹, Переплетчикова Д.А.¹,
Карагяур М.Н.², Малашичева А.Б.¹**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: safarodasha07@gmail.com*

Первичные гингивальные фибробласты человека являются незаменимым объектом для регенеративной биомедицины, так как могут дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях. Кроме того, они просты в получении и культивировании. Однако, гингивальные фибробласты, подобно другим первичным клеткам, культивируются ограниченное количество пассажей. Для этого получают иммортализованные клеточные линии, которые находят широкое применение в

медицинских исследованиях, биотехнологиях и персонализированной медицине.

Целью данной работы было получение стабильной иммортализованной линии гингивальных фибробластов человека. Иммортализованные клеточные линии получали с помощью гиперэкспрессии каталитического компонента человеческой теломеразы (hTERT). Для этого гингивальные фибробласты трансдуцировали лентивирусными частицами, собранными на основе плазмиды pVLT-EF1a-hTERT-puroR. Селективным маркером для отбора клонов являлась резистентность к пурамицину. Клетки после трансдукции культивировали в присутствии 0,7 – 3 мкг/мл пурамицина.

Для оценки потенциала иммортализованных клеток дифференцироваться в остеогенном направлении каждые 4 – 5 пассажей клетки культивировали с добавлением остеодифференцировочных факторов и сравнивали с первичными клетками. Степень дифференцировки клеток оценивали методом окраски ализариновым красным. Дополнительно с помощью световой микроскопии было показано, что иммортализованные линии сохраняли свою морфологию. Также была проведена количественная оценка экспрессии генов-маркеров *VIM* и *RUNX2* с помощью ПЦР в реальном времени и иммуноцитохимического окрашивания.

В результате была получена линия иммортализованных гингивальных фибробластов, способных к дифференцировке в остеогенном направлении в равной степени, как и первичные клетки. Данная линия клеток может быть использована для дальнейших исследований усиления или подавления остеогенной дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-15-00320.

**РЕДАКТИРОВАНИЕ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
ЛИНИИ КЛЕТОК ИПСК С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ *CASR*: ЕЩЁ
ОДИН ШАГ К ПОНИМАНИЮ РОЛИ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ
CASR В НАРУШЕНИЯХ ОСТЕОБЛАСТОГЕНЕЗА *IN VITRO***

**Семенова П.И.* , Сопова Ю.В., Краснова О.А.,
Неганова И.Э.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: psemenova2000@gmail.com*

Репрограммирование соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) стало одним из главных достижений в исследованиях стволовых клеток. Еще один прорыв в биомедицинских исследованиях был достигнут, когда была впервые использован метод CRISPR/Cas9 для клеток млекопитающих. Сочетание этих технологий открывает большие перспективы для клеточной терапии и регенеративной медицины.

Пациент-специфическая линия ранее была получена от пациента с гипокальциурической гиперкальциемией, ассоциированной со сложной гетерозиготной мутацией [c.1656delA, p.L554SfsX73] + [c.2217T>A, p.C739X] в гене кальций-чувствительного рецептора (*CaSR*), относящегося к семейству рецепторов, связанных с G-белками, и являющегося одним из эффекторов в процессах остеобластогенеза и ремоделирования костной ткани.

Клеточная линия, с исправленной мутацией c.1656delA сохранила типичную морфологию hiPSCs, экспрессию маркеров плюрипотентности (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *DPPA4*) и потенциал к дифференцировке в три зародышевых листка.

Были использованы методы дифференцирования пациент-специфичных, редактированных и контрольных иПСК в мезенхимальные стволовые клетки (иМСК); последующее остеогенное дифференцирование *CASR*-иМСК и контрольных иМСК; анализ и сравнение экспрессии генов остеогенных маркеров *RUNX2*, *COL1A1*, *BGLAP*, *SPPI*, *OGN* и *POSTN*, с помощью количественной полимеразной цепной реакции (qПЦР), окрашивание депозитов кальция с использованием ализаринового

красного S, а также окрашивание на маркеры ранней остеодифференцировки (*RUNX2*, *COL1A1*) методом иммуноцитохимии (ИЦХ).

Предварительные данные указывают на возможную роль мутации с.1656delA в гене *CaSR* в остеобластогенеза *in vitro*.

Данная работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение No 075-15-2021-1075 от 28/09/2021).

ОЦЕНКА СВОЙСТВ ФОТООТВЕРЖДАЕМЫХ БИОЧЕРНИЛ С КЛЕТОЧНЫМИ СФЕРОИДАМИ ДЛЯ 3D БИОПЕЧАТИ НА ОСНОВЕ БИОБУМАГИ ИЗ КОЛЛАГЕНА

Сенковенко А.М.^{1,2*}, Голубчиков Д.О.^{1,3}, Котенева П.И.¹, Бикмулина П.Ю.¹, Тимашев П.С.^{1,2,3}

¹ *Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт регенеративной медицины, Москва, Россия*

² *Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Центр "Цифрового биодизайна и персонализированного здравоохранения", Москва, Россия*

³ *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: senkovenko_a_m@staff.sechenov.ru*

3D биопечать – один из важнейших подходов тканевой инженерии для создания биоэквивалентов тканей и органов, применимых для трансплантации и исследований. Существует необходимость в разработке гидрогелевых биочернил для изготовления биоэквивалентов и оптимизации протоколов биопечати.

Клеточный компонент необходим для воспроизведения свойств и функций живой ткани. Часто в этой роли используют мезенхимные стромальные клетки (МСК) благодаря способности к дифференцировке в разные типы клеток. Для биопечати предпочтительнее использовать клеточные сфероиды –

плотнупакованные 3D культуры клеток, воспроизводящие *in vivo* клеточное окружение и способные переносить стресс при биопечати. Цель данной работы – разработка гидрогелевых биочернил для 3D биопечати сфероидами из МСК для создания биоэквивалента на основе коллагеновой биобумаги.

В данной работе основой фотоотверждаемых биочернил являются биосовместимые материалы – метакрилированные желатин (GelMA) и гиалуроновая кислота (НАМА). В ходе работы оценены реологические свойства этих биочернил, проведены опыты по биопечати различными составами биочернил на коллагеновую биобумагу в качестве основания для трансплантируемых биоэквивалентов, разработаны протоколы для биопечати. Биосовместимость подтверждена тестами жизнеспособности одиночных клеток (человеческие эмбриональные фибробласты линии 977 hTERT) и сфероидов из МСК человека. Были проведены наблюдения за жизнедеятельностью клеток и сфероидов в течение 7 и 14 сут. после печати. Структуры были охарактеризованы с помощью атомно-силовой микроскопии.

Таким образом, в работе описана процедура разработки биочернил, применимых для работы с клеточными сфероидами из разных типов клеток. Также в ходе исследования были напечатаны биоэквиваленты на коллагеновой биобумаге.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 23-15-00481).

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ КОЛЛАГЕНОВЫХ ФИБРИЛЛ НА ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ КРОЛИКА

**М.Ю. Сироткина^{1*}, А.В. Иноземцева¹, А.В. Нащекин²,
Ю.А. Нащекина¹**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*² Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: ms778321@mail.ru*

Тканеинженерные матрицы - носители для клеток, на основе полимерных подложек. Их разрабатывают с целью применения в регенеративной медицине, в том числе для восстановления роговицы глаза. Коллаген I типа широко используемый биополимер, известно, что при определенных условиях *in vitro* молекулы коллагена способны самопроизвольно формировать фибриллы схожие с фибриллами *in vivo*. Среди основных условий фибриллообразования выделяют определенный диапазон ионной силы, pH и температуры. От их варьирования может изменяться структура самих фибрилл, вместе с тем и поведение культивируемых на матрицах клеток.

Целью настоящей работы было исследование влияния физико-химических условий на процесс фибриллообразования и оценка воздействия полученных матриц на свойства клеток роговицы.

Коллаген I типа экстрагировали из сухожилий хвоста крысы. Изменение структуры матриц осуществляли при варьировании параметров фибриллообразования, а именно ионной силы раствора коллагена.

Также мы готовили указанный раствор в двух разных условиях предобработки. В первом случае до начала фибриллообразования раствор предварительно выдерживали при температуре 4 °C и затем инкубировали при стандартной температуре фибриллообразования. Во втором случае предварительной предобработки не производилось.

Процесс фибриллообразования фиксировали с помощью спектрофотометра (длина волны 310 нм) с построением

кинетических кривых мутности раствора. Полученный коллаген сушили и получали матрицы в виде пленок. На нем культивировали клетки линии SIRC из коллекции клеточных культур ИИЦ РАН.

Анализ кривых показал, что образцы, предварительно инкубированные при температуре 4 °С более непрозрачные после фибриллообразования по сравнению с контрольными образцами. С увеличением ионной силы раствора мутность образцов после фибриллообразования также повышается.

По результатам культивирования клеток было выявлено, что предварительная инкубация при температуре 4 °С и изменение ионной силы растворов не влияет на скорость миграции клеток на матрицах. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант No. 21-74-20120)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИДРОГЕЛЯ ИЗ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА НА МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МСК НА АНАЛИЗАТОРЕ SEAHORSE XF^E96 ANALYZER

**Слизов П.А.^{1*}, Закопайко Б.А.², Кондратенко А.А.¹, Товпеко
Д.В.¹, Чеботарев С.В.¹, Марченко Д.М.², Александрова С.А.²,
Калюжная Л.И.¹**

¹ *Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия*

² *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*
E-mail: maidel@bk.ru*

Недостаточность существующих методов лечения дегенеративно-дистрофических процессов суставного хряща и его ограниченная способность к самовосстановлению стимулируют исследователей к разработке клеточных технологий, в частности, тканевой инженерии. Это направление включает применение натуральных биосовместимых и биodeградируемых скаффолдов, обеспечивающих временную поддержку помещенных на них стволовых клеток, с последующим формированием хрящевой ткани. Перспективным материалом для этой цели может являться внеклеточный матрикс Вартонова студня (МВС) пуповины

человека. Ранее был разработан и запатентован (Патент № 2816034 от 25.03.2024 г.) гидролизованный бесклеточный продукт из МВС. Целью настоящей работы являлось определение интенсивности потребления кислорода (OCR) мезенхимных стволовых клеток (МСК) при добавлении МВС пуповины человека.

В исследовании применяли две клеточные линии МСК человека: FetMSC (костный мозг эмбриона) и MSCWJ-1 (Вартонова студия пупочного канатика), которые были предоставлены «Коллекцией культур клеток позвоночных» ЦКП ИНЦ РАН. Определение OCR клеток проводили при помощи анализатора Seahorse XF⁹⁶ Analyzer (Agilent Technologies, США). Клетки высевали в 96-луночный планшет и культивировали в течение трех суток в стандартных условиях (DMEM/F12, CO₂ 5%). После достижения 80% монослоя среду меняли на растворы МВС в питательной среде - 1, 2.5, 5, 7.5 и 10 мг/мл, инкубировали в течение суток, после чего производили измерение OCR. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Seahorse Wave (Agilent Technologies, США).

Добавление МВС в процессе культивирования к клеточным линиям FetMSC и MSCWJ-1 не оказывало значительного влияния на OCR в разных условиях, кроме роста на 35% при добавлении образца МВС 10 мг/мл к клеткам линии MSCWJ-1.

Гидролизованный матрикс из пуповины человека показывает отсутствие цитотоксичности и усиление энергетики клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках гос. задания (проект № FMFU-2021-0008).

ДОЛГОВРЕМЕННОЕ ОТСЛЕЖИВАНИЕ ЕДИНИЧНЫХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ФОТОПЕРЕКЛЮЧАЕМЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МИКРОКАПСУЛ

Смирнов И.В.^{1*}, Усатова В.С.², Ланин А.А.³, Сухоруков Г.Б.¹

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

² Федеральный центр исследований мозга и нейротехнологий
ФМБА, Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В.
Ломоносова, Москва, Россия

E-mail*: I.Smirnov@skoltech.ru

Изучение нейрональных прогениторных клеток человека (НПК), их поведения и миграции являются важными областями исследований в области биомедицины, особенно для потенциального терапевтического применения (Bond *et al.*, 2015). Однако безопасность использования НПК в стволовой терапии все еще остается предметом дискуссий из-за отсутствия информации о возможных долгосрочных изменениях клеток (Pollock *et al.*, 2018). Для долгосрочного наблюдения за единичными клетками используются флуоресцентные фотопереключаемые белки, но этот метод требует генетической модификации стволовых клеток, что вызывает вопросы по поводу их использования в персонализированной медицине (Zhang *et al.*, 2021). В этом исследовании мы представляем новый метод маркировки и отслеживания НПК без генетической модификации с использованием фотоконвертируемых полиэлектролитных микрокапсул, поглощаемых клетками.

В ходе работы были оценены возможность и оптимальные параметры фотопереключения капсул с двумя типами красителей (Родамин изоцианат и Флуоресцеин изоцианат, конюгированных с полиаллиламином) на двух системах конфокальной микроскопии – однофотонной (488 нм и 561 нм) и мультифотонной (790 нм и 1050 нм). Эти капсулы продемонстрировали низкую цитотоксичность, высокую способность к интернализации нейрональными клетками и

не влияли на способность миграции и дифференциации НПК в нейроны. После фотопереключения капсул под действием лазера клетки сохраняли свою морфологию и не вступали в апоптоз. Микрокапсулы в клетках сохраняли высокий уровень флуоресцентного сигнала и способность детекции в течение семи дней.

Таким образом, с помощью данного метода возможно придать каждой клетке индивидуальный стабильный «маркер» в виде определенного количества капсул разных цветов. Этот новый метод предлагает многообещающую альтернативу для изучения поведения и миграции НПК для долгосрочного отслеживания не только в монослойных культурах клеток, но и в тканях при регенеративной стволовой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-15-00292) и программы «Мозг» НИЦ «Идея».

РОЛЬ ФАКТОРА МЕХАНОТРАНСДУКЦИИ KLF4 В ПОДДЕРЖАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Смирнова Д.В.^{*}, Сафарова Д.Д., Ныров В.А., Малашичева А.Б.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: dariaasmirnoff@gmail.com*

Эндотелиальные клетки являются главными компонентами сосудистой системы, которые регулируют важные физиологические процессы, такие как ангиогенез, проницаемость сосудов и гемостаз. Эндотелий способен индуцировать и регулировать остеогенную дифференцировку мезенхимных клеток. Однако механизмы того, как эндотелиальные клетки взаимодействуют с мезенхимными клетками и регулируют остеогенную дифференцировку, недостаточно изучены. Исследования последних десятилетий привели к пониманию того, что члены семейства транскрипционных факторов KLF (Krüppel-like factors) участвуют в регуляции биологии эндотелия. В частности, два члена этого семейства, а именно KLF2 и KLF4 напрямую регулируют ключевые эндотелиальные гены.

Цель исследования: оценить влияние подавления экспрессии гена *KLF4* на функциональные свойства эндотелиальных клеток.

В работе использовали культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Подавление экспрессии гена *KLF4* проводили с помощью лентивирусных частиц, несущих малые шпилечные РНК (shKLF4). Для исследования влияния на функциональные свойства эндотелия проводили совместное культивирование эндотелиальных клеток с первичными остеобластами человека в остеодифференцировочной среде, содержащей 100 нМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбиновой кислоты и 10 мМ β-глицерофосфата. Степень остеогенной дифференцировки оценивалась с помощью окраски ализариновым красным через 14 дней.

Подавление экспрессии гена *KLF4* в эндотелиальных клетках приводит к увеличению экспрессии эндотелиальных маркеров *CD31* и *vWF*, что подтверждают данные ПЦР в реальном времени, а также иммуноцитохимический анализ. Кроме того, совместное культивирование остеобластов и изменённых эндотелиальных клеток приводит к снижению степени остеогенной дифференцировки, по сравнению с нормальным эндотелием.

Полученные данные указывают на существенную роль фактора KLF4 в эндотелии при регуляции остеогенной дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ проекта 23-15-00320).

ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ МОДЕЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА КОЖИ IN VITRO ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АНГИОГЕНЕЗА

Соловьёв Д.А.^{1,2*}, Лапина Е.С.^{1,2}, Чернета А.Е.^{1,2}, Александер-Синклер Э.И.¹

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: whale203@mail.ru*

Заживление ран – сложный динамический процесс, исследование которого является основополагающим для развития регенеративной

медицины. Исследование процесса ранозаживления, как и любого другого физиологического процесса, зависит от использования моделей. Для изучения этого процесса применяется множество различных экспериментальных моделей (*in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* и т.д.). Физиологически релевантные модели востребованы для как для понимания процессов ранозаживления, так и при разработке новых терапевтических подходов и средств для оптимизации этого процесса. Так как на данный момент единой идеальной модели для проведения таких исследований нет, то разработка новых моделей под определенные исследовательские задачи является актуальной.

Целью работы являлся поиск оптимальных условий сокультивирования клеток эндотелия сосудов и фибробластов кожи человека, необходимых при разработке модельного эквивалента кожи *in vitro* для изучения ангиогенеза – одного из ключевых механизмов ранозаживления. В работе использовали две неиммortalизованные клеточные линии человека: дермальные фибробласты (DF) и эндотелиоциты пупочной вены (HUVEC). Необходимо было определить какая из используемых для культивирования этих клеточных линий питательная среда (или сочетание сред) будет оптимальной при их сокультивировании. Сокультивирование клеток проводили при 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ в разных вариантах питательных сред. При сокультивировании оценивали морфологию, метаболическую активность клеток и особенности закрытия «раны» в условиях экспериментальной модели *in vitro*. Были выявлены различия во влиянии исследуемых питательных сред на жизнеспособность клеток, а также на особенности процесса их миграции при заживлении «раны», которая шла либо вдоль, либо поперек «раны», в зависимости от комбинаций клеток или сред. Полученные результаты являются основополагающими для проводимых нами исследований по разработке модельного эквивалента кожи *in vitro* в целях изучения ангиогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания ИИЦ РАН (проект № FMFU-2024-0008).

**ВЛИЯНИЕ ЛИГАНДОВ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО
ФАКТОРА РОСТА НА ДЕЦИДУАЛИЗАЦИЮ
ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

**Фатыйхов И.Р.* , Кошеверова В.В., Каменцева Р.С., Харченко
М.В., Корнилова Е.С.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: fatvykhov@gmail.com*

В эндометриальных мезенхимных стволовых клетках человека (энМСК) наблюдается высокий уровень экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (рЭФР). При этом, при воздействии таких лигандов как эпидермальный фактор роста (ЭФР) и трансформирующий фактор роста- α (ТФР- α) происходит длительное и значительное снижение уровня рецептора в клетках, но не при воздействии амфирегулина (АР). Также энМСК обладают высоким потенциалом дифференцировки. Они способны дифференцироваться в децидуальную, хрящевую, жировую и другие ткани, однако, данные о роли рЭФР в децидуализации противоречивы.

По этой причине, целью работы было проанализировать влияние ЭФР, ТФР- α и АР на децидуальную дифференцировку энМСК, оценивая уровень экспрессии маркеров децидуальной дифференцировки: пролактина и IGFBP1 (белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста1) методом ПЦР.

Воздействие лигандами и дифференцировочной средой (на основе 8-Vt-cAMP) на культуры клеток 2804 проводилось тремя способами:

- 1) Инкубация клеток с лигандами, без дифференцировки. В результате, несмотря на изменение уровня рецептора в клетках для ЭФР и ТФР- α (но не АР), экспрессия маркеров децидуализации не наблюдалась.
- 2) Инкубация с лигандами за 5 суток до воздействия дифференцировочной среды. В результате, экспрессия обоих маркеров оказывалась выше, чем при децидуализации клеток, не обработанных лигандами.
- 3) Инкубация с лигандами и дифференцировочной средой одновременно в течение 5 суток. При таком воздействии, ТФР- α и

ЭФР, но не АР, уменьшали экспрессию маркеров дифференцировки по сравнению с децидуализацией в отсутствие лигандов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что рецептор-опосредуемые сигнальные пути, стимулируемые АР, ЭФР и ТФР- α , оказывают различное влияние на децидуальную дифференцировку энМСК, в зависимости от времени воздействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 23-14-00335).

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИНЕРАЛИЗАЦИИ
И БИОСОВМЕСТИМОСТИ КОМПОЗИТНЫХ
КОЛЛАГЕНОВЫХ СКАФФОЛДОВ, НАПОЛНЕННЫХ
СТЕКЛОКРИСТАЛЛИЧЕСКИМИ МАТЕРИАЛАМИ**

Финк М.А.^{1,2*}, Александрова С.А.¹, Дарвиш Д.М.^{1,3}

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

³ *Санкт-Петербургский государственный университет
промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург,
Россия*

E-mail: maksim.fink@pharminnotech.com*

Разработка биоматериалов для регенерации костной ткани является ключевой и непрерывно развивающейся областью биомедицинских исследований. Биостекло, выступающее одним из наиболее перспективных материалов для остеопластики, обладает osteoconductive и osteoinductive свойствами, создавая благоприятную среду для адгезии и пролиферации остеобластов, способствуя образованию гидроксиапатита и стимулируя дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в остеобласты.

Целью данного исследования являлся сравнительный анализ минерализации и биосовместимости двух композитных коллагеновых скаффолдов, наполненных стеклокристаллическими наполнителями “Бросит СР-Элкор” и Bioglass 45S5.

Для изготовления скаффолдов порошкообразные наполнители вводили в раствор коллагена (5 мг/мл), затем для формирования гелей суспензию смешивали с нейтрализующим солевым раствором, содержащим NaCl, Na₂HPO₄, HEPES буфер и NaOH, и термостатировали при температуре 30 °С в течение 1 суток. Были изготовлены образцы с различным соотношением наполнителя к сухому коллагену: 1:4, 1:2, 1:1, 1.1 : 1. На последующем этапе наполненные коллагеновые гели стабилизировали действием EDC и NHS. Минерализацию проводили инкубацией в различных модификациях моделируемой биологической жидкости (SBF) при 37 °С в течение 30 дней, с последующей оценкой методом сканирующей электронной микроскопии. Биосовместимость исследовали по отношению к клеткам линии FetMSC (МСК костного мозга человека) методами световой микроскопии и МТТ-теста.

Сравнительный анализ показал различия в степени минерализации образцов, содержащих наполнители “Бросит СР-Элкор” и Bioglass 45S5. Исследование биосовместимости выявило адгезию клеток к полученным скаффолдам, однако было отмечено наличие некоторого цитотоксического эффекта у используемых наполнителей.

Исследование было выполнено с использованием клеточной линии и оборудования ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках гос. задания (проект № FMFU-2024-0008).

ИОННЫЕ КАНАЛЫ И ИХ КОМПЛЕКСЫ В 3D КУЛЬТУРЕ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

**Хайруллина З.М.*, Сударикова А.В., Васильева В.Ю.,
Шорохова М.А., Негуляев Ю.А., Чубинский-Надеждин В.И.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: khairyllinaa@mail.ru*

Трехмерные (3D) клеточные агрегаты (сфероиды) физиологически более приближены к условиям, наблюдаемым *in vivo*, по сравнению

с 2D культурой клеток. В связи с существенными изменениями свойств клеток и их взаимодействий между собой при 3D культивировании, профиль экспрессии, роль, механизмы регуляции ионных каналов и степень их участия в физиологических реакциях могут значительно отличаться от монослойной культуры. Для регистрации активности ионных каналов трехмерных клеточных агрегатов нами был разработан новый подход для образования стабильного сверхплотного контакта между регистрирующей пипеткой и фрагментом мембраны клеток, агрегированных в сфероиды. С помощью данного протокола нами впервые была зарегистрирована активность эндогенных одиночных ионных каналов в плазматической мембране клеток эндометриальных мезенхимных стволовых клеток (ЭМСК), собранных в сфероиды. На основе биофизических свойств, данные каналы идентифицированы как механочувствительные катионные каналы Piezo1, кальций-зависимые калиевые каналы KCa. Присутствие выявленных ионных каналов в сфероидах ЭМСК подтверждено с помощью широкого спектра молекулярно-биологических методов (от-ПЦР, real-time ПЦР, иммунофлуоресцентное окрашивание). Проведен анализ роли ионных каналов в физиологии клеток 3D культуры с помощью функциональных тестов (ингибиторный анализ, селективная фармакологическая стимуляция активности, измерение внутриклеточной концентрации ионов, оценка морфологических признаков, скорость реактивации сфероидов и т.д.). Результаты, полученные на сфероидах ЭМСК, сопоставлены с данными, ранее зарегистрированными на двумерной клеточной культуре. Получены предварительные выводы о сходствах и различиях в ионных механизмах клеточной сигнализации при 2D и 3D культивировании. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-74-10037).

СОЗДАНИЕ КОНТРОЛИРУЕМОЙ СТРУКТУРИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТИ ПКЛ МАТРИЦ ДЛЯ ЗАДАЧ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Чабина А.С. ^{1,*}, **Богданова Д. Н.** ^{1,2}, **Середкина П.С.** ¹,
Нашекин А.В. ³, **Просалов Н.Д.** ³, **Нашекина Ю.А.** ¹

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

³ *Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: chabina-alina@yandex.ru*

Топология поверхности является важным фактором в контроле поведения клеток на тканеинженерных конструкциях. Например, пористость или шероховатость могут усиливать адсорбцию белков, что в свою очередь способствует адгезии клеток, а наличие волокон или борозд – обеспечивать направленное движение клеток.

Следовательно, создание такой матрицы, топологию поверхности которой возможно предсказуемо контролировать, существенно улучшит биосовместимость тканеинженерных конструкций, что и стало целью данной работы.

Для этого было решено использовать полигидроксиэферы, например поли-ε-капролактон (ПКЛ), так как будучи синтетическим полимером он обладает подходящими физико-химическими свойствами, но недостаточной биосовместимостью, обусловленной, в том числе, гидрофобностью.

Такие недостатки ПКЛ, как гидрофобность и отсутствие сайтов связывания, было предложено устранить с помощью модифицирующих агентов. Для этого матрицы, полученные методом полива, инкубировали в 0,5М водном и 0,25М водно-спиртовом растворах аргинина при T=40°C (1 час) и T=25°C (24 часа). Для придания пористой топологии получали композитные матрицы из смеси двух полимеров (70% ПКЛ и 30% ПЭГ/ПЭГ-2NH₂), которые инкубировали в воде в течение суток для растворения фазы модифицирующего агента.

Топологию пленок изучали с помощью СЭМ, АСМ и оптической микроскопии, которые подтвердили образование пор и лунок в композитных матрицах, а также показали, что для чистого ПКЛ характерна кристаллическая структура, которая зависит от условий формирования и модификации матриц.

Увеличение гидрофильности после модификаций подтверждали методом сидячей капли. Для контроля распределения модифицирующих агентов на поверхности пленок к ним пришивали флуоресцентные метки.

Положительное влияние модификаций на адгезию и пролиферацию клеток было показано с помощью конфокальной микроскопии и спектрофотометрии. Также была изучена миграция клеток на матрицах. Было обнаружено, что матрицы с выраженной топологией снижают скорость движения клеток и определяют их направленность.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 21-74-20120).

Секция «Микробиология и протистология»

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМА ВИДООБРАЗОВАНИЯ ПРОТИСТ НА ПРИМЕРЕ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ

Анненкова Н.В.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, РФ

E-mail: tasha.annenkova@gmail.com

Благодаря современным методам стало возможным не только проводить более качественную идентификацию протист, но и изучать механизмы возникновения новых видов. С помощью RAD-секвенирования геномов в сочетании с анализом транскриптомов нами получены уникальные данные об идущих процессах видообразования в группе близкородственных динофлагеллят рода *Arcalatum*.

ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ MSMEG_0614 В MYCOLICIBACTERIUM SMEGMATIS СПОСОБСТВУЕТ УСТОЙЧИВОСТИ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Багаева Д.И. *, Демина Г.Р., Шлеева М.О.

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

E-mail: bagaeva115@mail.ru*

Переход бактерий *Mycolicibacterium smegmatis* (*Msm*) в состояние покоя *in vitro* сопровождается накоплением в их мембранах тетраметилкопропорфирина III (ТМК). Нами был обнаружен фермент *Msm* – MSMEG_0614, участвующий в метилировании копропорфирина III с образованием ТМК, а также получен и изучен штамм *Msm* с гиперэкспрессией этого фермента. В штамме с гиперэкспрессией MSMEG_0614 концентрация ТМК значительно увеличивается по сравнению с контрольным штаммом как в активных (в 5 раз), так и в покоящихся клетках (в 3 раза). Также была оценена устойчивость штамма *Msm* с гиперэкспрессией MSMEG_0614 к тепловому шоку и окислительному стрессу. В

результате установлено, что *Msm* с гиперэкспрессией MSMEG_0614 в 7 раз устойчивее к действию 40 мМ пероксида водорода и в 90 раз устойчивее к нагреванию до 80 °С по сравнению с контрольным штаммом. У штамма *Msm* с гиперэкспрессией MSMEG_0614 было выявлено снижение дыхательной активности на 35% по сравнению с контрольным штаммом. Такое же изменение активности дыхательной цепи происходило в клетках дикого штамма *Msm* при выращивании в условиях накопления ТМК.

Таким образом, с одной стороны, имея гидрофобную природу, ТМК может встраиваться в мембраны бактерий и замедлять работу функционирующих в них активных процессов, например, активность дыхательной цепи, что важно для замедления метаболизма в условиях стресса и подавления окислительных процессов. С другой стороны, сами порфирины, особенно их комплексы с металлами, могут выполнять защитные функции, в частности, выступать в роли антиоксидантов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-15-00221).

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ МИКРОСПОРИДИИ *NOSEMA BOMBUCIS* В КЛЕТКАХ НАСЕКОМЫХ ЛИНИИ SF9 С ПОМОЩЬЮ РНК- ИНТЕРФЕРЕНЦИИ.

Байазыт К.Д.К.*, Сендерский И. В., Тимофеев С. А.,
Долгих В. В.

*Всероссийский институт защиты растений, Санкт-
Петербург, Россия*

**E-mail: kamilcan@yandex.ru*

РНК-интерференция (РНКи) – механизм регуляции экспрессии генов в клетке, защищающий организм от вирусов и мобильных генетических элементов, основанный на деградации мРНК комплексом RISC и малой интерферирующей РНК (миРНК), выполняющей гидовую функцию. Так как РНКи является внутриклеточным процессом, возможно ее использование для

защиты окультуренных насекомых от внутриклеточных патогенов. В отличие от вирусов, микроспоридии – близкие к грибам возбудители опасных болезней одомашненных насекомых, отделены от цитоплазмы хозяина клеточной мембраной, а в подавлении транскрипционной активности их генов должен участвовать собственный аппарат РНКи. Поскольку генетический аппарат микроспоридий сильно редуцирован, а специфические SID (systemic-interference-defective) белки-переносчики дцРНК и клатрин-зависимый эндоцитоз отсутствуют, функциональную эффективность обнаруженных в геноме паразитов белков Dicer и Argonaute, участвующих в механизме РНКи, необходимо подтвердить.

Для оценки эффективности РНКи в подавлении микроспоридиозной инфекции в качестве объекта исследований был выбран возбудитель пембины тутового шелкопряда *Nosema bombycis*, культивируемый в клетках линии Sf9. Для подавления транскрипции генов репликации ДНК *N. bombycis* были использованы 4 подхода, подразумевающие липофекцию Sf9: (1) синтезированными *in vitro* фрагментами генов паразита в виде дцРНК; (2) смесью двух плазмид рIBV5-His для одновременной экспрессии «+» и «-» цепей дцРНК; (3) вектором рIBV5-His, модифицированным для экспрессии миРНК в виде шпилечных структур (мшРНК) под контролем промотора U6 РНК-полимеразы III *S. frugiperda*; (4) модифицированной плазмидой рIBV5-His с двумя разнонаправленными промоторами для одновременной экспрессии «+» и «-» цепей дцРНК. В случае липофекции готовой дцРНК, клетки сразу заражались спорами *N. bombycis*. В остальных случаях, перед заражением трансформанты отбирались на бластицидин-содержащей среде. К настоящему времени подавление инфекции показано в случае экспрессии ряда мшРНК под контролем промотора U6. При этом экспрессия отобранных вариантов не влияла на жизнеспособность трансформированных клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-16-00247.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
МЕТОДОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ БИОРАЗНООБРАЗИЯ
ИНФУЗОРИЙ-ЭНДОБИОНТОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО
ТРАКТА НЕПАРНОКОПЫТНЫХ (CILIOPHORA,
TRICHOSTOMATIA)**

**Белоконь М.Е.^{1,2*}, Сказина М.А.¹, Чистякова Л.В.²,
Корнилова О.А.³**

¹ *Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

² *Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Российской государственной педагогической университет
им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия*

**Email: belokon.me@gmail.com*

Инфузории-эндобионты пищеварительного тракта растительноядных млекопитающих принимают участие в процессах пищеварения хозяина и образуют сложные сообщества, отличающиеся значительным видовым разнообразием. Определение видового состава сообществ эндобионтных инфузорий в настоящее время основано преимущественно на использовании морфологических признаков и представляет собой довольно трудоемкий процесс. Значительно облегчить задачу могло бы использование молекулярно-генетических методов, в т.ч. метабаркодинга. Однако для инфузорий-эндобионтов кишечника непарнокопытных методическая база подобных исследований практически не разработана, в базе данных аннотированных нуклеотидных последовательностей «GenBank» доступны только последовательности гена 18S рРНК, причем меньше чем для половины известных видов. Использование метабаркодинга подразумевает создание базы данных последовательностей различных генов рассматриваемой группы инфузорий, определение уровня внутри- и межвидовых различий и выбор соответствующих генетических маркеров. Перспективным представляется исследование фауны инфузорий-эндобионтов животных из разных местообитаний, в том числе содержащихся в зоопарках.

Мы впервые определили нуклеотидную последовательность региона ITS трёх видов инфузорий-эндобионтов лошадиных - *Cycloposthium edentatum*, *Cochliatoxum periachtum* и *Tripalmaria dogieli* - и исследовали изменчивость отдельных их изолятов из разных видов хозяев и разных местообитаний, используя маркеры 18S рРНК и ITS. Для инфузорий-офриосколецид из рубца жвачных показано, что внутренний транскрибируемый спейсер (ITS-1 и, в меньшей степени, ITS-2) является более варибельным для оценивания генетической изменчивости инфузорий, чем 18S рРНК (Somasundaram, Yu, 2024). По нашим результатам, однако, число нуклеотидных замен в ITS-регионе различных изолятов инфузорий не превышает числа замен в гене 18S рРНК. Уровень внутривидовых различий у инфузорий – представителей разных семейств различается. Наиболее сходными оказались изоляты, выделенные из одного вида хозяина.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-24-00240.

**ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ
ЖИЗНЕННЫХ ЦИКЛОВ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ
*PROROCENTRUM CORDATUM***

Бердиева М.А. *, Калинин В.О., Палий О.С., Сафонов П.Ю.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, РФ

E-mail: maria.berd4@yandex.ru*

Динофлагелляты – это широко распространенная группа протистов, населяющих водные, в первую очередь, морские экосистемы, от арктических до тропических широт. Они представляют собой одну из доминирующих групп морского фитопланктона, являясь важнейшими первичными продуцентами и ключевым компонентом многих пищевых цепей. Динофлагелляты ответственны за опасные цветения воды, часто сопровождающиеся выделением их токсичных метаболитов, которые представляют угрозу для морских организмов и для здоровья человека. Для понимания особенностей расселения динофлагеллят и динамики их цветений первостепенную важность

представляют исследования их жизненных циклов, в том числе изучение молекулярных механизмов их регуляции.

Ранее нами был описан сложный жизненный цикл планктонных армированных динофлагеллят *Prorocentrum cordatum*, включающий чередование бесполого и полового размножения (Berdieva et al., 2020). Затем было показано, что дефицит фосфора в среде, по всей видимости, может являться ключевым фактором, стимулирующим переход *P. cordatum* к половому процессу (Kalinina et al. 2023). Для подтверждения результатов наблюдений был привлечен метод РНК-секвенирования. С использованием разработанного нами протокола выделения были получены образцы РНК из клеток динофлагеллят *P. cordatum*, культивируемых в условиях недостатка неорганических источников фосфора в среде, и клеток, выращиваемых в стандартных условиях. Получены данные РНК-секвенирования и выполнен анализ дифференциальной экспрессии генов. Мы обнаружили, что в клетках *P. cordatum* при дефиците фосфора повышается экспрессия генов, кодирующих белки, в первую очередь вовлеченные в процессы трансмембранного транспорта (в т.ч. фосфатов), процессы, связанные с метаболизмом белков и липидов, процессингом РНК, а также клеточным циклом, мейотической рекомбинацией и репарацией несоответствий. Таким образом, результаты РНК-секвенирования могут свидетельствовать в пользу нашего предположения о переходе динофлагеллят *P. cordatum* к половому процессу в условиях дефицита фосфора. Пониженную экспрессию демонстрировали гены, кодирующие белки, связанные с транспортными процессами, в частности, транспортом сульфата, фолдингом белков, связыванием РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФ (проект № 22-74-10097).

МИЕЛОПЕРОКСИДАЗА УВЕЛИЧИВАЕТ ИНВАЗИЮ БАКТЕРИЙ *SERRATIA* В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Берсон Ю.М.^{1,2*}, Горбунов Н.П.²

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-

Петербург, Россия

E-mail*: juletschka.ber@gmail.com

Эпителиальные клетки в организме человека часто подвергаются действию различных негативных факторов, в том числе контакту с патогенными и условно-патогенными бактериями. Проникшие в организм бактерии распознаются клетками иммунной системы, и одними из первых к месту проникновения рекрутируются нейтрофилы. Гранулы нейтрофилов содержат протеолитические и антибактериальные ферменты, например, миелопероксидазу (МПО), которая может высвобождаться во внеклеточное пространство (Aratani, 2018). МПО представляет собой катионную гемсодержащую галопероксидазу, бактерицидный эффект которой опосредован HOCl.

Бактерии рода *Serratia*, например, *S. marcescens*, *S. proteamaculans*, *S. grimesii*, способны проникать в эпителиальные клетки. Интернализация в клетки эукариот обеспечивает бактериям защиту от иммунной системы организма-хозяина. Было показано, что катионные белки нейтрофилов могут увеличивать адгезию и инвазию бактерий в эпителиальные клетки (Eilers et al., 2010).

Цель работы состояла в изучении действия МПО (в отсутствие H₂O₂) на инвазию бактерий *S. grimesii* и *S. proteamaculans* в эпителиальные клетки человека на примере М-HeLa и Caco-2.

Мы показали, что в ответ на заражение бактериями *S. grimesii* и *S. proteamaculans* клетки М-HeLa и Caco-2 продуцируют интерлейкин-8, который способствует привлечению нейтрофилов к очагу воспаления.

Было показано, что МПО, выделенная из нейтрофилов человека, проникает в клетки М-HeLa и приводит к образованию активных

форм кислорода, при этом реорганизация актинового цитоскелета не наблюдается.

Инкубация бактерий с эпителиальными клетками в присутствии МПО способствовала увеличению интернализации *S. grimesii* в клетки карцином на 40-50% и не влияла на инвазию *S. proteamaculans*. При этом предварительная инкубация эукариотических клеток с МПО приводила к уменьшению интенсивности инвазии *S. proteamaculans* на 20-30% и не влияла на чувствительность клеток к бактериям *S. grimesii*, что коррелировало с экспрессией гена, кодирующего β 1-интегрин. Таким образом, МПО может опосредовать инвазию бактерий не только за счет своего положительного заряда, но и за счет регуляции экспрессии β 1-интегрина, который участвует в инвазии исследуемых бактерий (Tsaplina et al., 2021).

РЕИЗОЛЯЦИЯ *POLYCHAOS DUBIUM* И НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА МОЛЕКУЛЯРНУЮ ФИЛОГЕНИЮ АМЕБ РОДА *POLYCHAOS*

Камышачкая О.Г.^{1,2}, Мезенцев Е.С.¹, Кулишкин Н.С.¹,

Таймарова К.М.¹, Смирнов А.В.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
E-mail*: oksana.kamyshatskaya@gmail.com

Среди голых лобозных амёб существует группа «протеусных» амёб, называемых так за внешнее сходство с *Amoeba proteus*. Все они до недавнего времени являлись представителями семейства Amoebidae (Euamoebida, Tubulinea, Amoebozoa). Однако, согласно недавним молекулярным исследованиям (Kamyshatskaya et al., 2020), род *Polychaos* был перенесен в другое семейство отряда Euamoebida – Hartmannellidae.

Филогенетическое родство с этими амёбами показано для 3 из 6 видов рода *Polychaos*: *P. annulatum*, *P. centronucleolus* и *P. insularis*. Другие представители этого рода, в том числе, типовой вид – *P. dubium* (Schaeffer 1916) не изучены на молекулярном уровне.

Единственный известный штамм *P. dubium* описанный в предыдущих работах (Flickinger, 1974; Page, 1988) был утрачен. Существует ряд признаков, отличающих этих амёб от других представителей рода *Polychaos*. Так, например, клетки *P. dubium* более крупные, при локомоции способны образовывать несколько выделяющихся особенно крупным размером псевдоподий. Также, в отличие от большинства представителей рода, они обладают гранулярным ядром, напоминающим ядро *Amoeba proteus*. В то же время, есть признаки, объединяющие *P. dubium* с другими представителями рода: наличие пальчатой полиподиальной локомоторной формы и клеточного покрова с филаментозным слоем гликокаликса. Соответственно, вопрос о принадлежности этого вида, *P. annulatum*, *P. centronucleolus* и *P. insularis* к одному и тому же роду остается открытым.

Из проб донного грунта пруда в окрестностях г. Вологда нами был выделен изолят «протеусных» амёб, напоминающих амёб рода *Polychaos*, была получена их клональная культура. Тщательные морфологические и ультраструктурные исследования подтвердили принадлежность изучаемого штамма к виду *Polychaos dubium*. Молекулярно-филогенетический анализ на основе последовательностей гена 18S рРНК показал, что изучаемые амёбы принадлежат роду *Polychaos*. В дереве они надежно группируется с другими видами этого рода, который высоко поддержан в целом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 23-24-00264 с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Культивирование микроорганизмов» Научного парка СПбГУ.

**РАЗРАБОТКА ПОДХОДА СПЕЦИФИЧЕСКОГО
ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЛКА МРТ64 И МЕТОДА FRET**
Касаткина С.И.* , Демина Г.Р., Сотников Д.В., Шлеева М.О.

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН, Москва, Россия
E-mail*: kasatkinasvetlana7722@gmail.com*

Секретируемые микобактериями туберкулезного комплекса белки, в том числе уникальный МРТ64, можно использовать для разработки новых методов быстрой и специфичной диагностики туберкулеза. На основе резонансного переноса энергии Ферстера (FRET) и с использованием белка МРТ64 был разработан подход для регистрации размножения микобактерий в жидкой среде в непрерывном режиме слежения. При этом донором энергии могут служить флуоресцентно меченные антитела (или антиген), а акцептором – конъюгаты золотых наночастиц и антигена (или антител). В результате переноса энергии при образовании комплекса возникает тушение флуоресценции донора. При добавлении такого комплекса в среду культивирования повышение концентрации антигена при размножении клеток приводит к конкурентному высвобождению меченого антигена из комплекса и возгоранию флуоресценции, что может быть зарегистрировано флуориметрически.

Для первой тест-системы в качестве донора энергии был использован флуоресцеин изотиоцианат (FITC), а в качестве акцептора – золотые наночастицы (GNP). Была собрана и опробована тест-система [Антитела+FITC]-[МРТ64+GNP] на супернатантах, полученных после центрифугирования растущей культуры *M. tuberculosis*. Эффект возрастания флуоресценции регистрировался на второй день культивирования. Для второй тест-системы в качестве донора флуоресценции был создан гибридный белок, включающий в себя МРТ64 и белок-флуорофор mCherry, в качестве акцептора использовался цианиновый краситель Cy5 в

комплексе с белком L. При апробации собранной тест-системы [МРТ64+mCherry]-[pL+Cy5] сигнал флуоресценции возрастает на шестой день роста культуры микобактерий.

Таким образом, с помощью данного подхода можно отслеживать размножение в жидкой среде клеток возбудителя туберкулеза, содержащихся в клинических образцах пациентов, а также решить проблему определения видовой принадлежности растущей культуры, что может упростить и ускорить диагностику туберкулеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 24-15-00221).

**НОВЫЙ ВИД *ZELONIA SP.* (KINETOPLASTIDA:
TRYPANOSOMATIDAE) — ПАРАЗИТ ИХНЕВМОИДНОГО
НАЕЗДНИКА *ALEXETER SP.* (HYMENOPTERA:
ICHNEUMONOIDEA)**

**Киричко А.А.^{1*}, Малышева М.Н.², Фролов А.О.², Ганиюкова
А.И.²**

¹ Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

² Зоологический институт Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

E-mail*: kaog07672@gmail.com

Подсемейство Leishmaniinae (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) объединяет как диксенных паразитов (в том числе известных возбудителей заболеваний человека и животных из родов *Leishmania* и *Endotrypanum*), так и моноксенных паразитов насекомых из родов *Novyomonas*, *Borovskya*, *Zelonia*. Изучение биологии последних значимо в контексте переходов трипаносоматид от моноксенных жизненных циклов к диксенным, однако биоразнообразие моноксенных лейшманиин исследовано крайне слабо.

Жгутиконосцы р. *Zelonia* распространены всесветно: отдельные изоляты обнаружены в Центральной и Южной Америке, Африке и Европе. На сегодняшний день круг их хозяев включает насекомых

из отрядов Hemiptera и Diptera, в том числе — кровососущие виды двукрылых.

Новый изолят *Zelonia sp.* S6 был получен в окрестностях реки Сось (ЯНАО, Россия) (67°06 N, 65°61 E) в 2016 году из кишечника самки осы-наездника *Alexeter sp.* (Hymenoptera, Ichneumonidae). Прежде представители этих трипаносоматид в перепончатокрылых насекомых обнаружены не были. Филогенетический анализ с использованием генов 18S рРНК и GAPDH указал на близкое родство данного изолята и *Z. daumondi*. Ширина ареала последнего, включающая Мадагаскар и северо-запад Европейской части России, позволяет предполагать, что *Z. daumondi* является космополитом (Malysheva et al., 2023). Однако локация обнаружения *Zelonia sp.* S6, расположенная за границами северного полярного круга, стала первой в азиатской части континента и, на сегодняшний день, наиболее северной для этой группы протистов.

Клетки *Zelonia sp.* S6 в кишечнике хозяина и лабораторной культуре представлены тремя основными морфотипами: промастиготами, парамастиготами и нетипичными удлинёнными опистомастиготами. В кишечнике хозяина преобладают промастиготы, в культуре доминирующим морфотипом являются опистомастиготы.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 122031100260-0 с использованием оборудования ЦКП «Таксон» ЗИН (Санкт-Петербург, Россия).

ВАРИАНТЫ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА У ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ И НОРМАЛЬНОЙ МАССОЙ ТЕЛА

Клименко Е.С. *, Белькова Н.Л.

*Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции
человека, Иркутск, Россия*

E-mail: klimenko.elizabet@gmail.com*

В настоящее время все больше исследований показывают, что микробиом кишечника тесно связан с ожирением, а кишечные

бактерии могут влиять на метаболизм человека (Gupta et al., 2020). Так как разнообразие микроорганизмов в кишечнике человека относительно невысоко, проводится типирование композиционных паттернов этих видов бактерий в разных возрастных когортах населения. Развивая концепцию энтеротипа, направленную на стратификацию кишечных микробиомов человека, проведены исследования кишечной микробиоты подростков с ожирением и нормальной массой тела.

Ранее мы описывали особенности микробиома кишечника у подростков, страдающих ожирением, на основании секвенирования ампликонов V3-V4 фрагмента гена 16S (Клименко и др., 2021; Клименко и др., 2022). Всего в исследование вошли 125 подростков - 59 подростков с нормальной массой тела и 66 подростков с ожирением.

Кишечный микробиом в основном был представлен филумами Bacteroidota (относительная частота составила $46.35 \pm 1.88\%$ от общего микробиома), Bacillota ($43.17 \pm 2.14\%$), Pseudomonadota ($7.45 \pm 0.83\%$) и Actinobacteriota ($1.90 \pm 0.57\%$). Филум Bacteroidota был представлен в основном такими родами, как *Bacteroides*, *Prevotella* и *Alistipes*, которые являются доминантными членами бактериального сообщества кишечника. Для Bacillota было характерно наличие *Dialister* и таксономических групп Ruminococcaceae UCG-002 и [*Eubacterium*] *coprostanoligenes*. В составе филума Pseudomonadota присутствовали *Sutterella*, *Serratia* и таксономическая группа *Escherichia-Shigella*, а среди Actinobacteriota наблюдались представители *Bifidobacterium* и *Collinsella*.

Нами было проведено типирование сообществ по доминантному компоненту - степени представленности доминирующих таксонов. Были выделены три группы: в первой доминирующим таксоном был род *Bacteroides* (тип В), во второй - *Prevotella* (тип Р) и третья группа (тип Mix) была представлена смешанным вариантом сообщества, при котором два и более таксона имеют сопоставимую представленность в консорциуме. Распространенность типа В в выборке составила 44,8% (56 из 125), типа Р - 13,6% (17 из 125), а

типа Mix - 41,6% (52 из 125). Помимо этого, смешанный тип кишечного сообщества почти в три раза чаще встречается у пациентов с ожирением (n=39), чем у пациентов с нормальной массой тела (n=13).

АКТИВАЦИЯ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА РЕКОМБИНАНТНЫМ ШТАММОМ БЦЖ-mGMCSF

Кондратьева Л.Г.^{1,2*}, Плешкан В.В.^{1,2}, Линге И.А.³,

Кондратьева С.А.¹, Алексеенко И.В.^{1,2}

¹ *Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

² *Национальный исследовательский центр «Курчатовский
институт», Москва*

³ *Центральный научно-исследовательский институт
туберкулеза, Москва*

E-mail: liakondratyeva@yandex.ru*

Известно, что вакцинация БЦЖ (Бацилла Кальмета-Герена, *Bacillus Calmette-Guérin*, BCG) способствует формированию не только специфического иммунитета против микобактерий, но и "тренированного" врожденного иммунитета ("trained immunity"). Этот процесс сопровождается метаболическим и эпигенетическим перепрограммированием клеток врожденного иммунитета, таких как макрофаги, моноциты и дендритные клетки. Усиление такой неспецифической защиты за счёт дополнительной экспрессии иммуномодулирующих цитокинов может быть использовано для разработки рекомбинантных вакцин.

На базе микобактериального вектора была получена генетическая конструкция, кодирующая последовательность гена мышинового цитокина mGMCSF. С помощью электропорации с последующей селекцией были получены клоны рекомбинантных БЦЖ, продуцирующие цитокин mGMCSF. Далее была изучена способность рекомбинантного штамма БЦЖ-mGMCSF стимулировать иммунный ответ *in vitro* и *in vivo* в сравнении с немодифицированным штаммом БЦЖ.

In vitro было показано, что инфекция клеток мышиных макрофагов RAW264.7 рекомбинантными бактериями БЦЖ-mGMCSF приводит к увеличению их пролиферативной активности и индукции экспрессии генов раннего иммунного ответа *Il1b*, *Ifng*, *Tnfa*. В экспериментах *in vivo* показано увеличение содержания нейтрофилов в перитонеальном экссудате и селезенке через два часа и 3 дня после внутрибрюшинного введения рекомбинантных бактерий БЦЖ-mGMCSF по сравнению с введением контрольных БЦЖ. Обнаружено, что иммунизация БЦЖ-mGMCSF вызывает секрецию *Ifng* во внутрибрюшинное пространство на более высоком уровне, чем иммунизация контрольными микобактериями. Эти данные свидетельствуют о том, что полученный рекомбинантный штамм БЦЖ-mGMCSF способен усиливать иммунный ответ *in vitro* и *in vivo*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00308, <https://rscf.ru/project/22-14-00308/>

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ВИДОВ РОДА *THECAMOEBA* (АМОЕВОЗОА; DISCOSEA)

Мезенцев Е.С.*, Шкляр А.А., Суркова А.А., Кулишкин Н.С.,
Смирнов А.В.

Санкт-Петербургский государственный университет,

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: e.mezentsev@spbu.ru*

Thecamoeba – широко распространенный род лобозных амёб, представителей которого сравнительно просто узнать в культурах и пробах благодаря плавным очертаниям и характерным складкам на поверхности (Page, 1988). Морфологические особенности локомоторной формы и характер распределения внутрядерных структур являлись удобными и одними из основных признаков для выделения видов текамеб.

Однако недавние молекулярные исследования показали наличие генетического разнообразия в рамках «классических» морфологических видов (Mesentsev et al. 2022). На данный момент

известно три морфологически обособленные группы, в пределах которых известно от двух до пяти генетически вариантов гена 18s рРНК.

Светомикроскопические исследования штаммов текамеб, которых морфологически можно отнести к группам видов *T. similis* и *T. quadrilineata*, показали большое внутривидовое разнообразие распределения ядрышкового материала внутри ядра – одного из основных идентификационных признаков. При этом диапазоны проявления этого и некоторых других признаков довольно сильно перекрывались между штаммами внутри каждой группы видов, что не позволяет выделить четкие и удобные межвидовые морфологические различия для их достоверного разделения.

Молекулярные исследования показали богатое генетическое разнообразие внутри каждой из изученных групп видов. Некоторые из генетических вариантов при попарном сравнении полной последовательности гена 18s рРНК различались лишь на доли процента. При этом эти слабо отличающиеся варианты были неоднократно получены из разных штаммов, изолированных из сильно удаленных географических точек, что указывает на высокую стабильности этого маркера. Наибольшая доля различий между последовательностями с наибольшим уровнем идентичности приходилась на V8 вариативный регион. Различия в последовательностях гена 18s рРНК внутри группы *T. quadrilineata* проявлялись также в наличии нескольких интронов первого типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №23-24-00397 с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Культивирование микроорганизмов», «Биобанк» Научного парка СПбГУ.

**ЗАВИСИМОСТЬ МОРФОЛОГИИ КЛЕТКИ
И ОСОБЕННОСТЕЙ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ПРОТИСТА
THRAUSTOCHYTRIUM AUREUM SSP. *STRUGATSKII* ОТ
УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

**Науменко Л.Г.^{1,2*}, Юхтанов Д.А.¹, Мензоров А.Г.^{1,2}, Морозова
К.Н.^{1,2}, Дорошков А.В.^{1,2}**

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

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск,
Россия*

*E-mail**: l.naumenko@g.nsu.ru

Labyrinthulea (Stramenopiles, SAR) – класс морских протистов, представители которого используются в промышленности как продуценты жирных кислот (Du et al., 2021). Эти протисты актуальны для биотехнологии (Singh et al., 2014; Sohedein et al., 2020; Sun et al., 2021), однако, несмотря на это, их жизненный цикл и ультраструктура различных стадий изучены недостаточно. Ранее мы описали нового представителя класса Labyrinthulea, принадлежащего к виду *Thraustochytrium aureum* sp., получили его транскриптом и показали присутствие ферментов, необходимых для синтеза жирных кислот (Konstantinov et al., 2022). Подвид *T. aureum* ssp. *strugatskii* прост в культивировании, что делает его удобным модельным объектом.

В настоящей работе мы оценили, как состав среды для культивирования влияет на скорость деления, количество дочерних клеток, рост биомассы и размер клеток *T. aureum* ssp. *strugatskii*. Трёхмерные модели клеток протиста на разных стадиях жизненного цикла были построены с использованием лазерной сканирующей микроскопии. Электронно-микроскопические изображения всех стадий жизненного цикла позволили нам добавить в модель данные об ультраструктуре исследуемых клеток. Мы реконструировали расположение органелл в зооспорах и вегетативных клетках и оценили различия в их ультраструктуре в зависимости от стадии, а также показали синхронность деления ядер в процессе роста клетки

и зависимость размеров клетки от количества ядер. Таким образом, мы описали ультраструктуру клеток *T. aureum* ssp. *strugatskii* и показали влияние состава среды на их размер. Полученные данные согласуются с наблюдениями, сделанным в ходе исследования других представителей Thraustochytriida (Kalidasan et al., 2021; Коорманн et al., 2023).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 24-24-00451).

МИКРОБИОТА ТУБЕРКУЛЁЗНОГО ОЧАГА: СОСТАВ И ИММУНОГЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ

Орлова Е.А.^{1*}, Шварц Я.Ш.², Огарков О.Б.¹, Колесникова Л.И.¹

¹ *Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции
человека, Иркутск, Россия*

² *Новосибирский научно-исследовательский институт
туберкулеза Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Новосибирск, Россия*

E-mail: elizaveta.a.orlova@gmail.com*

Микробиота лёгких способна влиять на развитие респираторных заболеваний, однако её роль при туберкулёзе (ТБ) малоизучена. Цель данной работы – определить состав и структуру микробиоты туберкулёзных очагов и оценить иммуногенность отдельных её представителей.

С помощью метагеномного секвенирования ДНК и микробиологического скрининга изучены 18 образцов казеума туберкулём. Рассчитаны индексы альфа-разнообразия бактериальных сообществ. Для выделения живых микроорганизмов стерильные образцы казеума помещали в жидкую среду, затем пересеивали на агаризованную среду до образования бактериальных колоний. Выделенные штаммы идентифицировали секвенированием. Клеточные лизаты микроорганизмов использовали для оценки Т-клеточного иммунитета человека с помощью IGRA-теста и влияния на формирование гранулём в

модели *M. tuberculosis* (МБТ)-индуцированного гранулёмогенеза *in vitro* на макрофагах и спленоцитах мышей.

В каждом образце туберкулём обнаружили ДНК МБТ, однако их доля варьировала от 5 до 96 %. Основные немикобактериальные семейства включали *Staphylococcaceae*, *Pasteurellaceae*, *Acetobacteraceae*, *Eggerthellaceae* и *Pseudomonadaceae*. Индексы разнообразия указывали на значительные различия между МБТ-богатыми и МБТ-бедными очагами.

Из двух образцов выделены штамм *Corynebacterium kefirresidentii* и два штамма *Staphylococcus epidermidis*. Лизат *C. kefirresidentii* обладал иммуногенностью в отношении Т-клеток больных ТБ и здоровых добровольцев. Для пациентов с сильным IFN- γ ответом на *C. kefirresidentii* характерна эозинофилия, что может указывать на инфекцию, вызванную персистенцией коринебактерий в лёгких. В модели индуцированного МБТ гранулёмогенеза добавление лизатов *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* усиливало рекрутирование клеток в гранулёмы, увеличивало количество и размер гранулём (дозозависимый эффект). Таким образом, в туберкулёзных очагах может формироваться специфическая патобиота, включающая коринебактерии и стафилококки, которые способны модулировать иммунный ответ хозяина и влиять на процессы формирования туберкулёзного очага.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания № 121022500179-0.

**НОВЫЙ ШТАММ VERMAMOEBA VERMIFORMIS
(АМОЕВОЗОА, ЕСНИАМОЕВИДА)
СОЛОНОВАТОВОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Палатайкова М.

Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: m.palataikova@gmail.com

Vermatomeba vermiformis (Page, 1967) – -свободноживущая амеба, которая привлекает внимание исследователей своей потенциальной

ассоциированностью с опасными заболеваниями человека (Centeno et al., 1996). Предыдущие изученные штаммы этого вида были найдены в пресноводных и почвенных биотопах (Park, 2016). В настоящем сообщении приводятся результаты исследования штамма *V. vermiformis*, впервые выделенного из солоноватоводного местообитания.

Амебы обнаружили в пробе воды из солоноватого озера соленостью 7,5‰ на побережье Черного моря. Материал пробы высевали в морские искусственные среды разных соленостей методом обогащающего культивирования. Изученный нами штамм был обнаружен в среде с соленостью 0,3‰. Штамм был изучен при помощи световой и трансмиссионной электронной микроскопии. Реконструкция филогенетических взаимоотношений была построена на основе генов 18S рибосомной РНК и субъединицы 1 цитохромоксидазы. Изучение реакции клеток на среды разных соленостей проводилось переносом клеток непосредственно из 0,3‰ в 10, 18, 30 и 40‰.

На основе морфологического и молекулярно-филогенетического анализа, изученный штамм был идентифицирован как *Vermamoeba vermiformis*. При этом построенные филогенетические деревья, объединяющие все доступные на данный момент последовательности разных штаммов *V. vermiformis*, указывают на наличие нескольких генетически отличающихся линий в пределах этого морфологического вида. Скрытое генетическое разнообразие выявляется по обоим проанализированным генам.

Тест на толерантность к солености подтверждает, что изученный штамм *V. vermiformis* может адаптироваться в средах с соленостью до 30%. Полученные данные показывают, что форма и размеры трофических клеток могут незначительно меняться при повышении солености.

Ранее считавшейся пресноводным видом *V. vermiformis* был найден в солоноватом биотопе. Эти амебы способны преодолевать барьер критической солености и размножаться в средах соленостью 18‰, а выживать до 30%. Выявление таких особенностей этого вида может иметь важное значение для понимания закономерностей его

географического распространения и разработки новых стратегий контроля и предотвращения амёбных инфекций.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20–14–00181); использовано оборудование ЦКП «Таксон» ЗИН РАН.

**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА
ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ *PROROCENTRUM CORDATUM* С
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

**Печковская С.А. *, Миттенберг. А.Г., Шмаков С.В.,
Филатова Н.А.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: sapechkovskaya@gmail.com*

Динофлагелляты *Prorocentrum cordatum* (синоним: *Prorocentrum minimum*) – это потенциально токсичные эукариотические микроводоросли, способные вызывать вредоносные цветения воды. Эти организмы синтезируют большое количество уникальных биологически активных вторичных метаболитов и пигментов. Согласно современным данным, около 60% препаратов, используемых при терапии онкологических заболеваний, имеют природное происхождение, что увеличивает интерес к биоактивным веществам из морских организмов, включая одноклеточные водоросли. В данной работе были получены водные и этанольные экстракты из культивируемых клеток динофлагеллят *P. cordatum*. В качестве опухолевых клеток-мишеней использовались культуры мышинных фибробластов линии 3Т3 и трансформированных вирусом SV40 фибробластов 3Т3-SV40.

Полученные экстракты были охарактеризованы методом масс-спектрометрического анализа. В результате выявлены основные группы белков, содержащиеся в водных экстрактах, и получены данные о липидах и пигментах в спиртовых экстрактах. Методом MTS-теста исследовано влияние экстрактов на жизнеспособность фибробластов 3Т3 и 3Т3-SV40. Показано, что обработка экстрактами приводила к снижению жизнеспособности

фибробластов, при этом влияние различалось в зависимости от типа экстракта и линии тестируемых клеток. Спиртовые экстракты в исследованных концентрациях незначительно снижали жизнеспособность нормальных фибробластов 3Т3 (на 18,9%), в то время как выживаемость трансформированных фибробластов 3Т3-SV40 существенно уменьшалась на 76,8% спустя 72 часа. Водные экстракты, в свою очередь, оказывали цитотоксическое действие на обе линии клеток, снижая их выживаемость до 54,4% для 3Т3 и до 52% для 3Т3-SV40. Таким образом, цитотоксическая активность при обработке клеток 3Т3-SV40 спиртовыми экстрактами показала IC50, равное 338,3 мкг/мл, тогда как для нормальных фибробластов 3Т3 IC50 составило 1033,5 мкг/мл.

Таким образом, этанольные экстракты из клеток динофлагеллят *P. cordatum*, содержат широкий спектр биологически активных веществ и демонстрируют цитотоксическое действие на трансформированные опухолевые клетки, при этом не оказывая значительного влияния на нормальные клетки, что делает их перспективными для дальнейших исследований *in vivo*.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ РНКАЗЫ А

Пиккулев М.А.^{1*}, Морозов И.А.

Пермский государственный медицинский университет им.

академика Е.А. Вагнера Министерства здравоохранения

Российской Федерации, Пермь, Россия

E-mail: pikylev.michail@mail.ru*

В последние годы возросла роль РНК-содержащих вирусов как возбудителей заболеваний человека (Левкова и др., 2020). Одним из путей снижения заболеваемости может быть использование РНКазы А, разрушающей РНК этих вирусов (Nishibata *et al.*, 2021). Таким образом, цель исследования состояла в изучении противовирусной активности РНКазы А в условиях *in vitro*, а также активности фермента в слюне человека.

Для исследований *in vitro* были отобраны 50 проб от пациентов с подтвержденным первичным диагнозом COVID-19. Препаратом

для исследования служила РНКазы А в концентрациях 0,5, 1, 5 и 10 мг/мл. Пробы инкубировали при температуре 4 либо 37°C на протяжении 20 мин либо 20 ч. Вирулицидное действие фермента оценивали при помощи количественной ПЦР с обратной транскрипцией.

Активность РНКазы слюны у здоровых добровольцев определяли по убыли оптической плотности окрашенного пиронином раствора РНК с помощью спектрофотометра. Кроме того, оценивали концентрацию общего белка слюны с использованием биуретовой реакции: это было необходимо для адекватного сравнения между группами, поскольку содержание белка в слюне отличается у разных людей. Добровольцы были разделены на две группы – переболевшие COVID-19 более 2 лет назад и в течение года.

Статистическую обработку данных осуществляли при помощи *t*-критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

В ходе работы была выявлена способность РНКазы А разрушать РНК вируса SARS-CoV-2 при концентрации фермента от 0,5 мг/мл и выше. Температурные условия и продолжительность инкубирования не оказывали существенного влияния на активность фермента.

При изучении активности фермента в слюне людей разного пола статистически значимых отличий не выявлено ($p = 0,84$). У людей, перенесших COVID-19 более 2 лет назад активность РНКазы А в слюне составила $4,04 \pm 0,83$, у перенёсших заболевание год назад - $1,59 \pm 0,54$ у.е. на 1 г белка ($p = 0,05$).

Таким образом, в ходе проведенных исследований выявлено, что РНКазы А проявляет противовирусную активность в концентрации от 0,5 мг/мл. Кроме этого установлено, что человеческая слюна обладает РНКазной активностью вне зависимости от пола, при этом активность фермента зависит от давности перенесенного COVID-19.

МОРФОЛОГИЯ ОКОМОТОРНОЙ ФОРМЫ И ОРГАНИЗАЦИЯ МИКРОТРУБОЧЕК У НЕКОТОРЫХ АМЕБ ИЗ ГРУППЫ DISCOSEA (АМОЕВОЗОА)

Полежаева В.А.^{1,2*}, Волкова Е.Н.¹

¹ Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

E-mail*: polezhaevalera@yandex.ru

Локомоторная форма у амёб служит признаком для идентификации видов и реконструкции филогенетических связей (Smirnov, Brown, 2004). Её организация и паттерн движения определяются пространственной организацией цитоскелетных белков в цитоплазме, что остается неизученными у большинства амёб, за исключением некоторых модельных объектов (Fukui, 2002; Pomorski et al, 2007). Амёбодное движение также встречается у многоклеточных животных. Было показано, что у представителей группы Амёбовоза в цитоплазме присутствует и микротрубочковый (МТ) цитоскелет (Tekle et al, 2016).

Для выявления пространственной организации МТ представителей группы Discosea (Amoebozoa) провели иммуноцитохимическое исследование следующих видов: *Vannella ebro* и *V. salarenaria* (Flabellinia, Vannellida), *Paramoeba atlantica* (Flabellinia, Dactylopodida) и *Acanthamoeba castellanii* (Centramoebia, Acanthopodida) с использованием моноклональных IgG кролика к α-тубулину. Фотографировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 980 (Carl Zeiss).

В локомоторных формах *V. ebro* и *V. salarenaria* МТ располагались в гранулоплазме, образуя фибриллярную сеть, достигающую гиалоплазму, но не заходящую в нее. В клетках *P. atlantica* МТ выявлялись лишь в облигатно присутствующем кинетопластидном симбионте (*Perkinsela amoebae*-подобный организм) вблизи ядра. У *A. castellanii* наблюдалась трехмерная фибриллярная сеть, рядом с ядром локализуется ЦОМТ. Иногда в клетках были заметны отдельные фибриллы, заходящие в область гиалоплазмы.

Эти данные показывают, что у разных представителей группы *Discosea* особенности пространственной организации МТ в цитоплазме локомоторной формы могут различаться. Сопоставление полученных данных с результатами более ранних исследований по пространственной организации F-актина показывают, что области локализации МТ и микрофиламентов в цитоплазме не пересекаются. МТ локализируются в основном в гранулоплазме.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» БИН РАН при поддержке гранта РФФИ № 23-24-00508. Благодарность выражается заведующему лаборатории клеточных и молекулярных механизмов развития растений БИН РАН Демченко К. Н.

**ЦЕНТРОХЕЛИДНЫЕ СОЛНЕЧНИКИ ВИДОВОГО
КОМПЛЕКСА *ACANTHOCYSTIS* “*TURFACEA*” (*HAPTISTA*,
CENTROPLASTHELIDA)**

Полузеров С. А.

Санкт-Петербургский государственный университет,

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: poluzerov24@gmail.com*

Центрохелидные солнечники – широко распространенная группа протистов, для которых характерно наличие заметного центра организации микротрубочек, неветвящихся псевдоподий – аксоподий, и эксцентрично расположенного ядра. Важной особенностью является присутствие у многих представителей твердых покровных элементов – органических спикул или кремниевых чешуек.

Долгое время детали строения кремниевых чешуек были основным признаком, который использовался для разделения видов и построения системы центрохелид. В настоящее время с описанием смены типов покровов стало ясно, что подход, при котором

используется только данные строения чешуек не является исчерпывающим (Drachko et al., 2020).

Acanthocystis turfacea является типовым видом рода. Для вида характерно наличие радиальных чешуек двух типов: коротких с длинными ветвями фурки на дистальном конце и длинных с короткими ветвями фурки. В первоописании вида также отмечаются следующие признаки: крупные размеры клетки (около 60 мкм) и наличие хлорелл в цитоплазме. Из-за малого количества данных в первоописании, солнечники, имеющие такой тип строения радиальных чешуек, стали определяться как *A. turfacea*, при этом авторами не учитывались другие характеристики: размеры клетки, тонкое строение чешуек, характер местообитания и наличие хлорелл в цитоплазме.

Нами были выделены клональные культуры и изоляты солнечников, которые можно идентифицировать как *A. turfacea*, и которые при этом сильно отличаются друг от друга. Предположительно, мы имеем дело с четырьмя новыми видами.

На основе полученных данных можно сделать несколько выводов. Во-первых, проведенный филогенетический анализ показывает, что солнечники рода *Acanthocystis* с бифуркацией на дистальном конце радиальной чешуйки занимают базальное положение – это может говорить о том, что это исходный тип строения чешуйки. Во-вторых, полученные нами данные не позволяют отнести какую-либо из изученных форм к *A. turfacea* из первоописания. Только крупные, пресноводные формы, имеющие хлорелл в цитоплазме, могут быть определены как *A. turfacea*.

Работа выполнена с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Нанотехнологии» Научного парка СПбГУ.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ БЕЛКА SEPF,
УЧАСТВУЮЩЕГО В ДЕЛЕНИИ
*ACHOLEPLASMA LAIDLAWII***

Сапожникова А.П.^{*}, Румянцева Н.А., Ведяйкин А.Д.

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра

Великого, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: sapogniktos@gmail.com*

Деление хорошо изученных бактерий (например, *Escherichia coli*) точно контролируется белковым комплексом, называемым дивисомой. Ключевой белок дивисомы FtsZ формирует Z-кольцо в будущем сайте деления и рекрутирует несколько вспомогательных белков, которые объединяются в мультибелковый комплекс. В состав Z-кольца входит несколько различных вспомогательных белков. SepF - один из таких белков у грамположительных бактерий. Он участвует в формировании Z-кольца, а также взаимодействует с C-концом FtsZ и прикрепляет FtsZ к цитоплазматической мембране. Важно отметить, что в настоящее время основной ролью дивисомы считается перестройка клеточной стенки, которая приводит к разделению материнской клетки на дочерние.

Acholeplasma laidlawii – представитель слабо изученной ветви бактерий класса *Mollicutes*. Отличительной чертой представителей этого класса является отсутствие клеточной стенки, поэтому механизмы деления данных микроорганизмов представляют особый интерес, как и роль основных белков деления, в т. ч. SepF.

В данном исследовании были изучены свойства белка SepF *A. laidlawii* в условиях *in vivo*. Были сконструированы две плазмиды, содержащие: а) ген *sepF*; б) ген, кодирующий слияние белка SepF и флуоресцентного белка mCherry. Использование первой плазмиды позволило установить, что белок SepF в клетках *E. coli* успешно нарабатывается и хорошо растворим. Вторая плазмида позволила наблюдать локализацию белка SepF в живых клетках *E. coli*. SepF обладает мембранной локализацией, что подтверждает его сходство с хорошо изученными гомологами. Кроме того, было обнаружено, что у делящихся клеток SepF концентрируется в области Z-кольца,

что может говорить о его взаимодействии с белками деления *E. coli* (например, FtsZ). Это косвенно указывает на участие белка SepF в процессе деления *A. laidlawii*. Также было установлено, что клетки *E. coli* при наработке данного белка имели уменьшенный размер, из чего можно сделать предположение о токсичности этого белка для данного вида бактерий.

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕКРЕЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРОТЕАЛИЗИНПОДОБНЫХ ПРОТЕАЗ

Светлова А.О.* , Карасева М.А., Чухонцева К.Н., Демидюк И.В.

*Национальный исследовательский центр «Курчатовский
институт», Москва, Россия*

E-mail: svetlovaanastasia@yandex.ru*

Протеализинподобные протеазы (ППП) – группа цинковых металлопротеаз семейства М4. Ферменты данной группы, несмотря на распространенность у бактерий, архей и грибов, малоизучены. В то же время опубликованные данные позволяют предположить, что ППП участвуют во взаимодействии микроорганизмов с высшими организмами и могут являться факторами патогенности бактерий при инфекции. Имеющаяся информация также указывает на то, что для выполнения своих функций ППП должны выходить из клеток. Однако информация о секреции этих ферментов противоречива. Наиболее изученный представитель ППП, титульный фермент группы – протеализин (Pln) из *Serratia proteamaculans*, не секретируется конститутивно и накапливается в клетках в виде неактивного предшественника. Напротив, гомолог Pln – протеаза S (PrtS) из *Phototribadus laumondii*, обнаруживается только в культуральной жидкости в виде активного зрелого фермента. При этом анализ аминокислотных последовательностей обеих протеаз не позволяет выявить ни одного из известных сигналов сортировки. Таким образом, ППП секретируются по неустановленному пути, причем, вероятно, механизмы секреции отличаются для разных ферментов группы.

Нами были получены штаммы *P. laumondii* и *S. proteamaculans* с делециями генов соответствующих ППП. В нокаутные бактерии были введены плазмидные векторы для экспрессии либо гена *prtS*, либо *pln*, после чего методом иммуноблоттинга было проанализировано накопление соответствующих ферментов в клетках и культуральной среде. Мы не обнаружили секреции Pln бактериями, а PrtS секретирувалась только клетками *P. laumondii*. Полученные данные впервые демонстрируют, что механизмы секреции ППП у разных бактерий либо действительно существенно отличаются, либо не все ППП являются секреторными.

Информация об истинной клеточной локализации и механизмах секреции ППП принципиальна для выяснения их биологических функций и, в частности, роли в патогенезе. Полученные нами данные позволяют предположить, что, несмотря на структурное сходство, биологические функции разных ферментов группы могут существенно отличаться.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА В ПРИДОННЫХ ЭКОТОПАХ АРКТИЧЕСКИХ МОРЕЙ И ИХ СВЯЗЬ С ГЕОЛОГИЕЙ И ГЕОХИМИЕЙ РЕГИОНА

Строева А.Р.

Московский государственный университет им. М.В.

Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: a.r.stroeva@yandex.ru

Баренцево-Карский шельф — один из наиболее экономически перспективных регионов Арктики с точки зрения его ресурсов, природных условий и географического положения. Для региона характерны микропросачивания углеводородов, которые зачастую оказываются недостаточно информативными для полной оценки нефтегазоносного потенциала. Однако, как известно, микроорганизмы крайне чувствительны к составу среды, что можно наглядно оценить по изменению состава микробных сообществ.

В докладе будет представлено описание структуры микробных сообществ донных отложений, которые ранее были практически не изучены. Комбинируя геологические и геохимические методы анализа углеводов-биомаркеров органического вещества донных отложений, а также микробиологические и статистические подходы к изучению состава микробных сообществ, установлены связи между определенными группами микроорганизмов и различными параметрами. Выявлены корреляции между обилием отдельных микробных таксонов и рельефом дна, толщиной морских осадков, наличием гидротролитовых прослоев и др., а также степенью зрелости органического вещества и индивидуальными полициклическими углеводородами.

Проведенная работа с использованием высокопроизводительного секвенирования и с использованием современных статистических подходов в экологии микроорганизмов является масштабной оценкой закономерностей распространения микроорганизмов в придонных экотопах Баренцево-Карского шельфа. В дальнейшем возможно использование корреляции микробных сообществ с геолого-геохимическими данными как нефтегазопоисковый критерий на акваториях.

**МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНОГО
СООБЩЕСТВА ИЗ ГЛУБОКОГО ПОДЗЕМНОГО
ИСТОЧНИКА БАКСАНСКОЙ НЕЙТРИННОЙ
ОБСЕРВАТОРИИ**

**Тарасов К.А.^{*}, Зарубин М.П., Яхненко А.С., Гангапшев А.М.,
Кравченко Е.В.**

¹ *Объединённый институт ядерных исследований, Дубна,
Россия*

² *Институт ядерных исследований РАН, Москва, Россия
E-mail*: ktarasov@jinr.ru*

Метагеномный подход к изучению микробных сообществ широко зарекомендовал себя в микробиологии. Он не только позволяет гораздо полнее описать разнообразие сообщества, чем классические

методы выделения микроорганизмов в культуру, но также является единственно возможным для исследования экстремофильных сообществ, представителей которых зачастую невозможно культивировать в лабораторных условиях. В данной работе представлены результаты метагеномного исследования микробного сообщества глубокого подземного источника Баксанской нейтринной обсерватории (Кабардино-Балкария, Россия), расположенного в 2 км под поверхностью г. Андырчи. Сообщество источника представлено, в основном, типами *Proteobacteria* (74% метагеномной ДНК) и *Planctomycetota* (16%). Типы *Nitrospirota*, *Mухосoccota*, *Cyanobacteriota*, *Armatimonadota* и *Gemmatimonadota* также представлены в сообществе и составляют в сумме около 10%. Исследуемое сообщество имеет сложный состав: в нём присутствуют продуценты первичных органических соединений, консументы, а также хищные бактерии. Первичными источниками углерода являются абиогенный метан (присутствуют метанотрофы I и II типа), а также углекислый газ (имеются представители, осуществляющие фиксацию углекислого газа в цикле Кальвина и пути Вуда-Льюнгдала). Также представлены различные группы, участвующие в биогенном цикле азота: азотфиксаторы, организмы, разлагающие сложные органические соединения азота, нитрификаторы, денитрификаторы, анаммокс-бактерии. Три представителя сообщества, вероятно, могут осуществлять реакцию диспропорционирования серы.

Представлена экологическая модель обмена веществ в источнике. Восстановленные соединения железа, водород, метан, аммиак вулканического и корового происхождения могут служить источниками энергии для микробного сообщества. Большая доля микроорганизмов, способных разлагать сложные субстраты (крахмал, целлюлоза, хитин, пептиды, мочевины), свидетельствует о возможном наличии питания источника также и поверхностными водами с растворённой органикой.

Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда № 24-24-00003.

**PROVORA: НОВАЯ СУПЕРГРУППА ПРОТИСТОВ
И СОВРЕМЕННОЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ДРЕВО
ЭУКАРИОТ**

Тихоненков Д.В.

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

E-mail: tikho-denis@yandex.ru

В докладе будут рассмотрены современные представления о филогенетическом древе всех эукариотических организмов, проиллюстрированы основные супергруппы эукариот и их ключевые представители. Будет описана история открытия новой супергруппы Provora, представленной хищными микробиальными эукариотами, выделенными из географически удаленных морских местообитаний. Будут представлены результаты их морфологического и геномного исследования.

**РОЛЬ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА ІВРА
В ДЕЛЕНИИ И ЗАЩИТЕ ОТ СТРЕССА КЛЕТОК
МИКОПЛАЗМЫ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII*
Ведяйкин А.Д.¹, Усатых А.А.^{2*}, Вишняков И.Е.²**

¹ *Научно-исследовательский комплекс «Нанобиотехнологии»,*

Санкт-Петербургский политехнический университет

Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

² *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: andrew.usatih@yandex.ru*

Малые белки теплового шока (мБТШ) играют одну из ключевых ролей в защите от стресса практически любой клетки, предохраняя белки-партнёры от необратимой денатурации и агрегации, а также участвуя в процессах распознавания и транспортировки неправильно свернутых белков. Данные свойства мБТШ могут быть использованы в медицине и биотехнологии. Микоплазмы рассматривают в качестве естественной модели «минимальной» клетки, они являются частыми контаминантами клеточных культур, а также способны вызывать микоплазмоз у растений, животных и

человека. Особенно интересен вид *Acholeplasma laidlawii*, способный автономно существовать вне клеток хозяина. Мы предполагаем, что существенную роль в этом может играть белок IbrA, мБТШ *A. laidlawii*.

Целью работы являлось определение структурно-функциональной роли мБТШ IbrA *A. laidlawii in vitro* и *in situ*. Для достижения поставленной цели использовали иммуно-электронную микроскопию, а также негативное контрастирование образцов с последующим их исследованием методом трансмиссионной электронной микроскопии. В ходе работы были получены результаты, согласно которым при 4 °С белок *in vitro* формирует длинные фибриллы и пучки, а при 30 °С образует короткие фибриллы, олигомеры шарообразной формы и крупные агрегаты. Однако при 42 °С с добавлением PEG 4000 в качестве краудинг-агента белок формирует крупные капли 50-100 нм в диаметре, вероятно образующиеся по принципу фазового разделения. Исследования *in situ* подтверждают результаты, полученные *in vitro*. Вероятно, мБТШ защищает клетки *A. laidlawii* от стресса, выполняя не только функции шаперона, но и выступая в качестве агента, структурирующего пространство клетки. Формирование фибрилл в подмембранном пространстве при холодовом стрессе может выполнять роль механической защиты микоплазменной клетки от разрушения. А образование динамичных капель мБТШ в комплексе с белками-партнёрами по принципу фазового разделения жидкость-жидкость при повышенных температурах может способствовать сохранению и правильному фолдингу частично денатурированных в условиях стресса белков.

Работа была выполнена на средства грантов РФФИ (проекты №20-34-90066 и 20-04-00760).

**МОРФОЛОГИЯ И ФИЛОГЕНИЯ ДВУХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
СЕМЕЙСТВА AMPHIACANTHIDAE (ORIPSTHOKONTA:
MICROSPORIDIA)**

**Фролова Е.В.^{1*}, Райко М.П.¹, Бондаренко Н.И.², Смирнов А.В.^{1,2},
Насонова Е.С.^{1,2}**

¹ *Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: uroborospora@gmail.com*

Мечниковеллиды - группа микроспоридий, известная своими уникальными морфологическими особенностями и эволюционным значением. Это внутриклеточные паразиты грегариин (Apicomplexa), обитающих в пищеварительном тракте морских аннелид. Мечниковеллиды имеют два типа спорогонии. Споры могут образовываться либо прямо в цитоплазме грегариин, либо под мембраной вакуоли в результате свободной спорогонии. При втором типе спорогонии проходит эндогенно под толстостенной общей оболочкой в составе т.н. споровых мешков, форма и размеры которых видоспецифичны. Филогеномные анализы позиционируют мечниковеллид как сестринскую группу всех высших Microsporidia. Однако точная конфигурация филогенетического дерева мечниковеллид остается нерешенной, отчасти из-за ограниченной выборки таксонов. На данный момент четко выделяется клада Amphiacanthidae. Представители этого семейства имеют веретенovidную форму спорового мешка, для которого характерны острые полюса с нитевидными отростками.

В данной работе представлены результаты прижизненных наблюдений и филогенетического анализа двух *Amphiacantha* spp. из грегариин полихет *Scoletoma fragilis* Белого моря.

В грегариинах *Lecudina longissima* обнаружены *A. longa* Caullery & Mesnil, 1914. Споровые мешки продолговатой формы с острыми концами и нитевидными отростками, размерами 107,4-191,3 мкм в длину и 7,4-17 мкм в ширину (n=31). Нитевидные отростки имели

длину около 30. Размеры спор внутри спорового мешка варьировали в следующих диапазонах: 2,8-3,8 x 1,8-2,3 мкм (n=31). В одном мешочке насчитывалось более 100 спор. Свободные споры имели размеры 2,6-3,7 x 1,8-2,4 мкм.

Особи другого вида грегариин - *L. elongata* - были заражены мечниковеллидами, споровые мешки веретенообразной формы, размером 29–61,1 x 7,6–13 мкм, с двумя отростками по 25 мкм длиной. В споровых мешках насчитывалось 29-48 спор размером 2,1-3,1 x 2,6-4 мкм. Свободные споры были немного больше: 2,4-3,3 x 3,5-4,5 мкм.

Филогенетический анализ последовательностей мс рРНК показал, что полученные последовательности формируют на дереве монофилетическую кладу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 23-74-00071).

СВОЙСТВА БЕЛКА FTSA MYCOPLASMA GALLISEPTICUM

Хасанова А.А. *, Румянцева Н.А., Ведяйкин А.Д.

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра

Великого, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: hasanova_aizilya@mail.ru*

Mycoplasma gallisepticum – бактерия из класса *Mollicutes* (микоплазмы), представители которого характеризуются уменьшенным размером генома, отсутствием клеточной стенки и упрощенной организацией клеток. *M. gallisepticum* является патогеном птиц, наносит экономический ущерб сельскому хозяйству, при этом изучена сравнительно слабо. В частности, механизмы клеточного деления для данного вида не установлены. Важно отметить, что белки деления бактерий рассматриваются как мишени для новых антибиотиков, которые могут быть эффективны в том числе при лечении микоплазмозов. Поэтому изучение механизмов деления *M. gallisepticum* является актуальной задачей. Процесс деления хорошо изученных бактерий координируется белковым комплексом – дивисомой, который включает в себя в том

числе консервативный гомолог актина FtsA. FtsA обеспечивает ассоциацию ключевого белка деления FtsZ с мембраной в процессе деления *E. coli*, дестабилизирует полимеры FtsZ и стимулирует их тредмиллинг. Предполагается, что FtsA участвует в активации дивисомы, которая заключается в старте синтеза пептидогликана, что и приводит к разделению материнской клетки на дочерние. Важно подчеркнуть, что роль FtsA в процессе деления микоплазм неизвестна.

Целью данной работы являлось получение очищенного белка FtsA *M. gallisepticum* и его дальнейший анализ. Были сконструированы плазмиды, кодирующие слитые гены белков FtsA и МВР (Maltose-binding protein), а также слитые гены белков FtsA и mCherry. Белок FtsA оказался слабо растворим, что показано проверкой на растворимость и наличием телец включения при визуализации с помощью флуоресцентного микроскопа. Проверка на растворимость была основана на сравнении наличия белка МВР::FtsA в осадке и надосадочной жидкости после центрифугирования лизата. Белок МВР::FtsA демонстрирует большую растворимость при комнатной температуре и при 30°C, чем при 37°C. Нарботка искомого белка была подтверждена при помощи пептидного фингерпринтинга.

РАЗНООБРАЗИЕ АМЕБ РОДА *DERMATOEBEA* (АМОЕВОЗОА: DISCOSEA) ИЗ НАЗЕМНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ

Чикадзе Е.Д.*, Мезенцев Е.С.

Санкт-Петербургский государственный университет,

Санкт-Петербург, Россия

E-mail: st107864@student.spbu.ru*

Dermamoeba (Амoebozoa: Discosea) – род голых лобозных амёб, представители которого широко распространены в почвенных и пресноводных местообитаниях (Page and Blakey, 1979). Амёбы этого рода имеют уникальные сложные толстые покровы, благодаря которым клетки имеют плавные очертания во время активного движения по субстрату. Для многих дермамёб неоднократно

отмечено питание водорослями и грибами, что позволяет предположить их важное место в трофических цепях почвенных экосистем (Smirnov et al., 2011). Несмотря на это, остро ощущается нехватка данных по этой группе лобозных амёб. На сегодняшний день описано четыре вида, а молекулярные данные имеются только по двум из них.

В ходе данной работы мы изучили 10 штаммов дермамёб, изолированных из различных по составу наземных проб, собранных на территории России, Индии, Кипра и Сейшельских островов.

По морфологическим признакам многие из исследованных штаммов были идентифицированы как *D. fibula*. Амёбы из штаммов 156, 149, КМЧ, КП43 и Ymir имеют меньший размер и, вероятно, являются новыми для науки видами. Амёбы штамма Rosa сильно крупнее остальных и идентифицированы как *D. algensis*. Большинство амёб штамма Г11 имеют ядро с двумя ядрышками, а также по размерным характеристикам подходят под описание типового вида *D. granifera*. Однако, у организмов в наших культурах не были обнаружены золотистые тельца, характерные для *D. granifera* и *D. minor* (Page, 1988).

Полученные результаты показали широкое географическое распространение многих известных морфологических видов дермамёб. Однако, небольшое количество морфологических признаков, которые можно использовать для идентификации дермамёб на уровне световой микроскопии, а также ощутимая нехватка современных работ по этой группе амёб, позволяет с большой долей вероятности предположить наличие значительного скрытого разнообразия в пределах рода *Dermatoeba*.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-74-00050 с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Культивирование микроорганизмов», «Биобанк» Научного парка СПбГУ.

ПРОТЕАЛИЗИН КАК ФАКТОР ВЫЖИВАНИЯ БАКТЕРИИ *SERRATIA PROTEAMACULANS*

Чухонцева К.Н.*, Демидюк И.В.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский
институт», Москва, Россия

E-mail*: ksysha57@bk.ru

Протеализин (ПЛН) – металлопротеаза грамотрицательной бактерии *Serratia proteamaculans*. ПЛН является прототипом группы протеаз, представители которой широко распространены у бактерий. Опубликованы данные, указывающие на участие протеализин-подобных протеаз во взаимодействии бактерий с другими организмами и, вероятно, в патогенезе, однако биологическая роль этих ферментов остается неясной.

Биологические функции протеаз обычно связаны с их активностью. Мы показали, что в клетках *S. proteamaculans* ПЛН накапливается в виде предшественника и активируется внутри клеток только после выхода культуры в стационарную фазу роста (СФР). Активация протеазы у бактерий дикого типа (ДТ) сопровождается снижением оптической плотности культуры (ОПК). При этом у полученного нами штамма с делецией гена ПЛН (Δpln) снижения ОПК в СФР не наблюдается. В то же время для обоих штаммов в СФР характерно значительное (на 12 порядков) снижение количества КОЕ, что может быть связано с гибелью клеток или их переходом в некультивируемое состояние. Анализ внутриклеточных белков методом электрофореза в течение 10 суток культивирования показал, что в клетках Δpln состав белков и их количество существенно не меняется. Однако в клетках ДТ наблюдается снижение общего количества белка, что коррелирует с активацией ПЛН и снижением ОПК. Следовательно, наблюдаемое различие ОПК штаммов, может быть связано с деградацией внутриклеточных белков мертвых и/или некультивируемых клеток ДТ.

Переход бактерий в СФР связан с недостатком питательных веществ. Одной из стратегий выживания популяции в таких условиях является снижение плотности бактериальной культуры.

При этом погибшие клетки выступают в качестве источника питательных веществ. Обнаружен ряд механизмов программируемой клеточной гибели, которые, в частности, ответственны за реализацию этой стратегии у бактерий (Llorens et al., 2010). Наблюдаемое нами снижение количества КОЕ при переходе *S. proteamaculans* в СФР, по-видимому, является примером реализации одного из таких механизмов. А ПЛН в рамках этого механизма, вероятно, участвует в извлечении питательных веществ из погибших клеток. Таким образом, можно предположить, что протеализин является новым фактором выживания бактерий в условиях голодания.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

ДВА НОВЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ВИДА В РОДЕ

THECAMOEBA

Шкляр А.А. *, Мезенцев Е.С.

Санкт-Петербургский государственный университет,

Санкт-Петербург, Россия

E-mail*: arseniy.shkliar@gmail.com

Thecamoeba (Амoeozooa: Discosea) – род голых лобозных амёб, представители которого характеризуются отсутствием дискретных псевдоподий в локомоторной форме, плавными и округлыми очертаниями, а также наличием характерных складок на поверхности (Page, 1977; Smirnov et al., 2011). Эта группа амёб была одной из немногих, для разделения видов которой использовались только светомикроскопические признаки.

В ходе работы по изучению почвенных текамёб было установлено два штамма текамёб (Ta187 и Ta188), каждый из которых является новым морфологическим видом. Амёбы штамма Ta187 имели ядро с одним ядрышком, наиболее схожим с ядрышком амёб *T. aesculea* и *T. sphaeronucleolus*. Однако в сравнении с клетками этих двух видов, клетки штамма Ta187 имеют меньшие размеры. Также в ядре клеток изученного штамма иногда присутствовали светопреломляющие

тельца, которые не были описаны у текамёб. У клеток штамма Ta188 была отмечена полиморфность структурной организации ядрышкового материала, зависящая от возраста культуры. Амёбы в молодых культурах (возрастом менее недели) несли ядро с визуально неплотным ядрышком, занимающим почти весь объём ядра. В старых культурах (более месяца) амёбы обычно имели ядрышко более плотное и компактное. Ядра амёб этого штамма были наиболее схожи с ядрами амёб *T. quadrilineata*, однако ядрышко штамма Ta188 было негомогенным. Единичные клетки этого штамма по организации ядрышкового материала были схожи с амёбами *T. astrologa*.

Высокая степень сходства отдельных амёб изученных штаммов с амёбами известных видов показывает необходимость установления культур и длительных наблюдений для идентификации текамёб на морфологическом уровне. Также это ставит под вопрос правильность идентификации текамёб на небольшом числе клеток в фаунистических исследованиях. Кроме этого, морфологические отличия этих штаммов от уже известных видов могут быть замечены только с использованием сложных светомикроскопических методов, позволяющих получить изображение высокого разрешения на большом увеличении. Таким образом, единственным удобным способом идентификации текамёб по единичным клеткам являются молекулярно-генетические методы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-24-00397 и ресурсных центров Научного парка СПбГУ «Культивирование микроорганизмов», «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Биобанк».

РОЛЬ IGA-АНТИТЕЛ В КОНТРОЛЕ МИКРОБИОМНОГО СООБЩЕСТВА

Шокина В.А. *, Баклыкова О.С., Матюшкина Д.С.,
Киселева Е.В., Говорун В.М.

*Научно-исследовательский институт системной биологии
и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия*
E-mail*: v.shokina@sysbiomed.ru

Иммуноглобулины класса А (IgA) играют роль первой линии защиты на слизистых оболочках. Известно, что антитела IgA важны для регуляции гомеостаза между микробиотой кишечника и организмом-хозяином, однако механизмы их взаимодействия ещё не полностью изучены. Ограниченность изучения взаимодействий IgA с микробиотой связана с трудностью выделения секреторных антител в кишечнике, поэтому на данный момент появляется всё больше исследований с использованием моноклональных рекомбинантных IgA-антител.

На основе последовательности IgA-антител, продуцируемых плазматическими клетками кишечника мышей линии C57BL/6, было синтезировано рекомбинантное моноклональное антитело. С использованием иммуноферментного анализа (ИФА) с иммобилизованными клетками *E. coli* была проверена специфичность связывания рекомбинантного антитела с пробиотическими, лабораторными и патогенными штаммами бактерий рода *Escherichia*. Также была проверена способность рекомбинантного IgA-антитела влиять на процесс биопленкообразования этих штаммов.

Результаты ИФА показали, что IgA-антитела обладают высокой специфичностью к пробиотическому штамму *E. coli Nissle 1917* в сравнении с лабораторными и патогенными штаммами. Кроме того, антитела класса А усиливали способность пробиотического штамма *E. coli* к формированию биопленок, что может указывать на регуляторную роль антител IgA в кишечнике в отношении пробиотических и патогенных штаммов микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания №122030900051-9

Научное издание

Материалы IX Молодежной школы-конференции
по молекулярной и клеточной биологии
Института цитологии РАН
Санкт-Петербург, 15–18 октября 2024

Отпечатано с готового оригинал-макета в ЦНИТ «АСТЕРИОН»
Заказ № 114. Подписано в печать 01.10.2024 г.
Бумага офсетная. Формат 60×84 ¹/₁₆. Объем 20,75 п.л. Тираж 30 экз.
191015, Санкт-Петербург, Суворовский пр-т, 61, пом. 23Н,
тел. (812) 685-73-00, 970-35-70

: asterion@asterion.ru : <https://asterion.ru/>

: https://vk.com/asterion_izdatelstvo