

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет
Кафедра биохимии

IV межвузовская студенческая конференция

**СТУДЕНЧЕСКИЙ
БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ
2024**

30, 31 марта и 1 апреля 2024 г.

Материалы конференции

УДК 577
ББК 28.07

*Оргкомитет благодарит руководство Биологического факультета
МГУ за помощь в проведении конференции*

Оргкомитет конференции

А.Г. Катруха (председатель оргкомитета), Д.В. Серебряная
(ответственный секретарь), М.В. Судницына, М.В. Уфимцева,
Д.А. Адашева, В.В. Воинова, В.М. Шатов, А.И. Заболотский,
А.С. Рыжавская, Л.К. Муранова, Н.А. Ломов, М.А. Замотина,
В.А. Катруха, Н.Н. Киреева, О.В. Букач, К.А. Богоцкой,
Е.С. Беличенко

СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2024

IV межвузовская студенческая конференция: 30, 31 марта и 1 апреля
2024 г., Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический
факультет. Материалы конференции/ Отв. ред. А.Г. Катруха.
Сост. В.М. Шатов

Научное издание

IV межвузовская студенческая конференция
СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2024
30, 31 марта и 1 апреля 2024 г.

Составление и верстка: В.М. Шатов
Дизайн обложки: В.А. Катруха
Дизайн: Е.С. Беличенко

УДК 577
ББК 28.07

Схема здания Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Схема здания Биологического факультета

этаж сектор	2	3	4	5
A2	204-224 201-219	301-307 302-324	401-417 402-420	501-517 502-514
A1	M-1 220, 222a	317a-317b	4-4a	5-5a
B2	221-227 226-234	319-329 326-338	419-431 422-440	519-535 516-530
B1	229-239 236-250	331-343 340-360	433-445 442-458a	537-545 532-546
B1	241-245 230, 254-256	345-355 362a-370	449-459 460-464	547-555 548-552
B2	ББА 258	357-363	461-463 466-468	557-559r 500, 556
B3	247-255 260-266	365-375 372-380	497-499r 494-498ж	559a-571b 558-566
Г1	257-271 268-280	377-389 382-392	487-495 482-492	579-587 568-580
Г2	273-285 282-294	391-399 394-398	497-499r 494-498ж	582-594 589-599б
Д1	M-2	399e-399д		5д
Д2	287-299 296-298	399ж-399п 398a-398с	499e-499p 498и-498д	599в-599м 598-598н

Источник: <http://www.bio.msu.ru> (с модификациями)

На схеме символом «#» обозначены места, в которых будут проходить различные мероприятия конференции.

Контакты организаторов конференции



+7 916 173-47-10 Серебряная Дарья Владимировна
 +7 977 376-00-96 Уфимцева Мария Витальевна
 +7 985 923-22-48 Катруха Алексей Генрихович

ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

IV СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ

30 марта

С 14.00

Регистрация — рекреация перед Большой биологической аудиторией

Размещение постеров

Секции «Молекулярная и клеточная биология», «Биотехнология» — рекреация перед Большой биологической аудиторией;

секции «Биохимия» и «Физиология и медицинская биохимия» — рекреация перед аудиторией М1.

- Открытие форума

Большая биологическая аудитория

15.00–15.10

вступительное слово декана Биологического факультета МГУ, д.б.н., академика РАН, М.П. Кирпичникова

15.10–16.00

пленарная лекция

Д.Ю. Логунов, д.б.н., академик РАН, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи РФ, Москва
Как разработать вакцину. Современные векторные платформы



16.00–16.30

перерыв на кофе

- Секция «Фундаментальные и прикладные исследования»

Большая биологическая аудитория

- Подсекция «Биохимия»

Ведущие секции — к.б.н. Н.А. Ломов, к.б.н. Д.В. Серебряная

16.30–17.10

Н.Н. Случанко, д.б.н., в.н.с. ФИЦ Биотехнологии РАН
Красота и сила структурной биологии



17.10–17.25

И.В. Кузьминов, Г.К. Гаджиев, К.В. Брютова,
Тюменский государственный медицинский университет, Тюмень
Молекулярные механизмы биотрансформации и токсикодинамики противовирусного препарата «Рибавирин»



ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

IV СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ

31 марта

● Подсекция «Молекулярная и клеточная биология»

Большая биологическая аудитория
Ведущие секции — к.б.н. Н.А. Ломов, к.б.н. Д.В. Серебряная

10.00–10.40

В.С. Фишман, к.б.н., факультет естественных наук НГУ, Новосибирск
Получение и анализ больших геномных данных

10.40–10.55

Н. Г. Шebarдина¹, Т.К. Булгаков², А.М. Мойсенович², Д.В. Чистяков¹, Е.Ю. Зерний¹, Т.НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, ²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
Нейротоксические эффекты цинка при глаукоме: роль фактора пигментного эпителия сетчатки

10.55–11.25

перерыв на кофе

● Подсекция «Физиология и медицинская биохимия»

Большая биологическая аудитория
Ведущие секции — д.б.н. О.С. Тарасова, д.б.н. А.Г. Катруха

11.30–12.10

А.М. Петров, д.б.н., профессор, Казанский институт биофизики и биохимии КазНЦ РАН, Казань
Окислительные в межклеточной коммуникации или новая жизнь холестерина после окисления

12.10–12.25

В.В. Мазалов, Д.Х. Исмаилова, В.И. Чечёхин, П.А. Тюрин-Кузьмин, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
Влияние регуляторных факторов стресса на чувствительность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани к норадреналину

12.25–12.55

перерыв на кофе

● Подсекция «Биоинженерия»

Большая биологическая аудитория
Ведущие секции — д.б.н. О.С. Тарасова, д.б.н. А.Г. Катруха

12.55–13.35

Е.Г. Максимов, д.б.н., Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
Природоподобные и природнеподобные технологии

13.35–13.50

Д.М. Малабуёк^{1,2}, Е.А. Петров¹, Ю.А. Мокрушина^{1,2}, С.С. Терехов¹, А.Г. Габибов^{1,2}, ¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, ² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва
Опухоль-инфильтрирующие В-лимфоциты как резервуар для поиска опухоль-специфичных антител

13.50–14.30 — обед

● Секция «Биотехнологические компании»

Большая биологическая аудитория
Ведущий секции — д.б.н. А.Г. Катруха

14.30–15.10

Г.А. Хунтеев, к.м.н., директор по науке, «Репид-Био»
«Репид-Био» — от стартапа до успешной биотехнологической IVD компании

15.10–15.50

Д.А. Потеряев, к.б.н., советник по научным вопросам, АО «Генериум»
Как функционирует и разрабатывает лекарства современная биофармацевтическая компания. Пример «Генериум».

15.50–16.30

А.Б. Постников, к.б.н., руководитель научного отдела, ООО «Хайтест»
Разработка антител для in vitro диагностики. Опыт «Хайтест»

16.30–17.15

круглый стол
Работа в академической науке и в биотехнологической компании.
Что общего и в чем различия?

С 17.45 — культурная программа.

Прогулка на теплоходе по Москве-реке



ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ

IV СТУДЕНЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ФОРУМ

1 апреля

◆ С 9.00

постерная сессия

Секции «Молекулярная и клеточная биология», «Биотехнология» — рекреация перед аудиторией Большой биологической аудитории;
секции «Биохимия» и «Физиология и медицинская биохимия» — рекреация перед аудиторией М1

9.00–10.30

постерная сессия

10.30–11.00

перерыв на кофе

11.00–13.00

постерная сессия

13.00–13.30

перерыв на кофе

◆ Секция «Ученые делятся опытом»

Большая биологическая аудитория

Ведущие секции — к.б.н. О. И. Клычников, к.б.н. Г. А. Носов

13.30–14.10

О.В. Подгорный, к.б.н., Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук

Как правильно подготовить рукопись статьи в зарубежный журнал



14.10–14.50

М.А. Лагарькова, д.б.н., профессор, член-корр. РАН, ФГБУ ФНКЦ ФХМ имени Ю.М.Лопухина ФМБА
Научная этика



14.50–15.00

перерыв на кофе

15.00–15.40

В.С. Фишман, к.б.н., факультет естественных наук НГУ, Новосибирск

Карьера ученого: займись тем, что тебе нравится, и ты не будешь работать ни дня в своей жизни



15.40–16.00

А.О. Семихина, руководитель группы по образовательным проектам АО «Генериум».

Карьера в «Генериум» до окончания ВУЗа



16.00–16.20

Ю.А. Николаенко, старший специалист по подбору и адаптации АО «Генериум»

Взгляд рекрутера внутри фармбизнеса



16.30–17.30

заккрытие форума

Секция «Доклады»

Д1. Молекулярные механизмы биотрансформации и токсикодинамики противовирусного препарата “Рибавирин”

И.В. Кузьминов (kowendi3@gmail.com)¹, Г.К. Гаджиев¹, К.В. Брютова¹

¹Тюменский государственный медицинский университет, Россия, Тюмень

Введение. Сегодня рибавирин является “золотым стандартом” лечения гепатита. При приеме рибавирина возникает не мало побочных эффектов, одним из таких является гемолитическая анемия. В литературных источниках приводится информация об активации свободнорадикального окисления. Мы задались целью изучить причину активации пероксидации эритроцитов и определить молекулярный механизм токсикодинамики.

Методы. В ходе работы были использованы отмые эритроциты человека и хроматографический очищенный рибавирин. Для очистки фермента G6PD отмые эритроциты подвергались соникации, далее $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и диализовали. Подтверждение теории связывания с NADP-сайтом оксидоредуктаз проводили с стандартом фермента HMGCR. Для получения метаболитов эритроциты инкубировали с хроматографически очищенным рибавирином при $t=37^\circ\text{C}$ в течение 24 часов, после чего подвергали их соникации и экстрагировали метаболиты в этилацетат. Метаболиты очищали путем препаративной ВЭЖХ, присутствие в выделенной фракции подтверждали путем ГХ в сравнении с внутренними стандартами. Для оценки влияния выделенных метаболитов на ферменты использовали 96 луночный планшет и ридер Mindray-96A. Реакции проводили в реакционной смеси состоящую из буфера, субстрата и NADP в разных концентрациях.

Результаты. В результате экспериментов удалось выделить метаболиты рибавирина - трифосфаты и установить что механизм развития свободнорадикального окисления связан с ингибированием метаболитами коферментного сайта NADP-зависимых оксидоредуктаз, активность G6PD снизилась на 19,4% активность HMGCR снизилась на 97,9%, но при увеличении концентрации NADP ингибирующая активность снижалась, что позволяет сделать вывод о конкурентном механизме ингибирования.

Выводы. Ингибирование G6PD приводит к снижению выработки NADPH_2 что инактивирует Se-зависимую глутатион пероксидазу, подобное явление приводит к накоплению свободных радикалов в клетке и усиливает процессы пероксидации и приводит к гемолизу, токсичность метаболитов заключается в их фосфорилированной форме из за которой они не могут покинуть клетку.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Тюменского государственного медицинского университета по приоритетным направлениям научно-технологического развития Российской Федерации

Д2. Нейротоксические эффекты цинка при глаукоме: роль фактора пигментного эпителия сетчатки

Н. Г. Шебардина (*natuskasheb@gmail.com*)¹, Т. К. Булгаков², А. М. Мойсенович², Д. В. Чистяков¹,
Е. Ю. Зерный¹

¹НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Глаукома — нейроофтальмологическое заболевание, характеризующееся гибелью ганглиозных нейронов сетчатки. Механизм нейродегенерации при глаукоме включает цитотоксическое действие внеклеточного мобильного цинка, опосредуемое сигнальными белками. Одним из таких белков может быть фактор пигментного эпителия PEDF, который регулирует нейротропную активность в сетчатке и недавно идентифицирован нами как цинксвязывающий белок. Настоящая работа посвящена исследованию эффектов цинка в отношении нейротропной функции PEDF на клеточных моделях сетчатки.

Методы. Эксперименты проводили на линиях ретинобластомы (Y79), нейробластомы (SH-SY5Y) и пигментного эпителия (ARPE-19) человека. Цитотоксические эффекты цинка характеризовали с помощью клеточных тестов и проточной цитометрии. Изменения транскриптома клеток в условиях цинкового стресса определяли с помощью высокопроизводительного РНК-секвенирования на платформе Illumina и биоинформатического анализа. Секреция PEDF исследовалась методом иммуноблоттинга. Влияние цинка и нейротропную активность PEDF оценивали, сравнивая его защитное действие при окислительном и цинковом стрессах, а также способность свободного и Zn²⁺-связанного белка индуцировать нейрональную дифференцировку и аксоногенез методами иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии. Эффекты цинка на способность PEDF активировать специфический рецептор PEDF-R исследовали путем измерения фосфолипазной активности последнего в реконструированной системе методом таргетной масс-спектрометрии.

Результаты. Установлено, что клетки линий ARPE-19 и Y79 обладают выраженной чувствительностью к цинковому стрессу, в ответ на который происходит их гибель путем апоптоза. В условиях цинкового стресса наблюдается подавление экспрессии ряда генов, связанных с нейротропной активностью, с одновременным компенсаторным усилением секреции PEDF. При этом присутствие цинка снижает дифференцирующую и аксогенную активность секретируемого PEDF, а также ингибирует его цитопротекторное действие, что связано с ингибированием способности этого белка активировать PEDF-R.

Выводы. Рост мобильного цинка, характерный для глаукомы, может обуславливать дефицит нейротропной активности в сетчатке и гибель ганглиозных нейронов путем ингибирования сигнального пути PEDF/PEDF-R. Таргетирование этого механизма может служить перспективным подходом к терапии глаукомы.

Д3. Влияние регуляторных факторов стресса на чувствительность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани к норадреналину

В.В. Мазалов (mazalov2000@mail.ru)¹, Д.Х. Исмаилова¹, В.И. Чечёхин¹, П.А. Тюрин-Кузьмин¹

¹Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Стресс оказывает сильное влияние на различные аспекты жизни. При этом, хронический стресс может привести к серьезным проблемам со здоровьем, влияя на конкретные органы и ткани. В данной работе рассмотрено воздействие стрессорных факторов на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) жировой ткани. МСК под действием норадреналина способны реализовывать феномен гетерологической сенситизации (ГС) - механизм транзientного переключения внутриклеточной сигнализации на кальций-зависимый путь с увеличением поверхностных α_1A -адренорецепторов. Через этот феномен изменяется фенотип МСК, что может способствовать развитию артериальной гипертензии. Нами было исследовано влияние гидрокортизона (синтетического аналога кортизола, одного из основных гормонов стресса на ряду с норадреналином) и сывороточной депривации (модель клеточного стресса) на чувствительность МСК к норадреналину.

Методы. В исследовании использовались различные методы клеточной биологии: асептическое культивирование клеток эукариот, центрифугирование, прижизненное окрашивание клеток эукариот, прижизненная флуоресцентная микроскопия. Для обработки полученных данных использовались методы статистического анализа.

Результаты. В данной работе было показано, что гидрокортизон является равным по силе норадреналину индуктором ГС. Индукция осуществляется как в условиях депривации, так без нее. При этом сывороточная депривация уменьшает способность клеток отвечать кальциевой сигнализацией, опосредованной феноменом ГС. Помимо этого, был выявлен паттерн временного изменения кальциевого ответа, опосредованного ГС: увеличение отвечающих клеток с 6 до 12 часов, затем падение на 24 часах; на более поздних временных точках имеется повторное статистически значимое увеличение кальциевого ответа для индукторов в полной питательной среде (на 48 часах у норадреналина и на 72 часах у гидрокортизона), но при депривации данное повышение не обнаруживается.

Выводы. 1. Гидрокортизон способен запускать феномен гетерологической сенситизации в МСК жировой ткани.

2. Временная развертка выявила общий паттерн изменения уровня кальциевых ответов, опосредованных гетерологической сенситизацией: увеличение отвечающих клеток с 6 до 12 часов, затем падение на 24 часах. На более поздних временных точках (48 и 72 часа) имеется повторное статистически значимое увеличение кальциевого ответа для индукторов в полной питательной среде, но при депривации данное повышение не обнаруживается.

3. Сывороточная депривация, как модель стресса, уменьшает кальциевый ответ, опосредованный гетерологической сенситизацией.

Д4. Опухоль-инфильтрирующие В-лимфоциты как резервуар для поиска опухоль-специфичных антител

Д.М. Малабуйок (*malabuyok@mail.ru*)^{1,2}, Е.А. Петров¹, Ю.А. Мокрушина^{1,2}, С.С. Терехов¹, А.Г. Габиров^{1,2}

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

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

Введение. Положительный прогноз колоректальной карциномы коррелирует с наличием опухоль-инфильтрирующих В-лимфоцитов (ТІВ). Анализ биоразнообразия ТІВ создает новые возможности для разработки терапии на основе опухоль-специфичных антител.

Методы. После резекции опухоли проводили выделение опухолевых клеток с использованием комбинации механической и ферментативной обработки. Выделенные клетки использовали для создания первичной культуры опухолевых клеток, а также реконструкции биоразнообразия иммуноглобулинов В-лимфоцитов. Сочетанием оригинальной микрофлюидной технологии с эмульсионной ПЦР с обратной транскрипцией получали вариабельные фрагменты антител (scFv) из В-лимфоцитов. Библиотеку генов scFv клонировали в вектор pPIC9K для интеграции в геном дрожжей *Pichia pastoris* и презентации заякоренных scFv. Поиск опухоль-специфичных клонов осуществляли в процессе биопэннинга дрожжевых библиотек на первичные раковые клеточные линии. Приоритизацию отобранных на опухолевые клетки клонов проводили по результатам высокопроизводительного секвенирования. Полноразмерные антитела реконструировали с использованием полученных последовательностей scFv в виде антител класса IgG1. Для идентификации потенциальных антигенов, к отобранным антителам, использовали метод иммунопреципитации с дальнейшим протеомным анализом.

Результаты. Компарментализация В-лимфоцитов в отдельных каплях эмульсии позволила провести реконструкцию природных комбинаций тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов из ~105 ТІВ для каждого пациента. Созданные 4 библиотеки генов scFv пациентов и проанализированы на наличие опухоль-специфичных антител. Идентифицировано антитело 3.4, обогащающиеся в рамках биопэннинга, и определен потенциальный опухолевый антиген данного антитела – трансмембранный гетеродимерный белок интегрин $\alpha 3\beta 1$. Окрашивание флуоресцентно меченным антителом 3.4 показало наличие антигена в 5 образцах опухолевых клеток пациентов с колоректальным раком, что составило 62.5% (n=8), а также в раковых клеточных линиях HCT15, HCT116, MDA-MB231, BT474. В то же время было показано отсутствие антигена при окрашивании панели здоровых тканей (n=6). Полученные результаты свидетельствуют, о перспективе использования интегрин $\alpha 3\beta 1$, находящегося на поверхности раковых клеток, для таргетной иммунотерапии. Антитело 3.4 было успешно использовано для адресной доставки химиотерапевтического агента монометил ауристатина Е к опухолевым клеткам *in vitro*, а также для визуализации опухолевых клеток *in vivo* в мышинной модели ксенотрансплантата.

Выводы. Глубокое функциональное профилирование репертуара ТІВ позволяет детектировать опухоль-специфичные антитела, а также новые онкомаркеры, обладающие высоким терапевтическим потенциалом.

Данная работа поддержана грантом РФФ № 23-44-00043

Секция «Биохимия»

БХ1. Посттрансляционное ацетилирование фактора транскрипции E2F1 в нейронах перифокальной области фототромботического инфаркта

Е. А. Борисенко (evgeniabor11@gmail.com)¹, П. Н. Стоянова¹, С. В. Демьяненко¹

¹Южный Федеральный Университет, лаборатория «Молекулярная нейробиология», Россия, Ростов-на-Дону

Введение. Фактор транскрипции E2F1 является мультифункциональным белком с неупорядоченной структурой, активность которого зависит от его посттрансляционных модификаций. 14 лизинов, расположенных в ДНК-связывающем домене, могут ацетилироваться/деацетилироваться, что влияет на апоптотическую активность белка. О роли ацетилирования E2F1 в регуляции выживания и апоптоза нейронов после ишемического повреждения ничего не известно. В связи с этим, целью работы являлось исследование ацетилирования E2F1 по лизинам 117 (E2F1AcK117) и 125 (E2F1AcK125) в нейронах перифокальной области фототромботического инфаркта (ФТИ) коры мозга крыс.

Материалы и Методы. Иммунофлуоресценция ацетилированного E2F1. Сравнение уровня E2F1AcK117 или E2F1AcK125 в относительных единицах в ядерной фракции коры у ложнооперированных крыс и в перифокальной области инфаркта через 4, 24 часа и 7 суток после ФТИ.

Результаты. После ФТИ уровень ацетилирования E2F1 по лизинам 117 и 125 в нейронах значительно не изменялся ни в первые 24 часа, ни через 7 суток после ишемии. Ацетилирование E2F1 PCAF по лизину 125, но не по лизину 117, приводило к структурным изменениям в белке, закрывая его трансактивационный домен, тем самым мешая его связыванию с регуляторными белками.

Выводы. Деацетилирование E2F1AcK125 HDAC1 может способствовать инактивации белка. Увеличение уровней цитоплазматической PCAF и HDAC1 в первые сутки после ФТИ, вероятно, сохраняет баланс ацетилирования E2F1 в условиях роста белка в этот период, препятствуя апоптозу ишемических нейронов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ № FENW-2023-0018» и гранта РФФИ 21-15-00188.

БХ2. Селективность липид-связывающих сайтов температурноактивируемых ионных каналов TRPV1 и TRPV3

И.И. Веретененко (veretenenko.ii@phystech.edu)^{1,2}, Ю.А. Трофимов^{2,3}, Р.Г. Ефремов^{2,1}

¹Московский физико-технический институт (НИУ), Россия, Долгопрудный

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

³Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Россия, Москва

Введение. Ионные каналы семейства TRPV экспрессируются на плазматической мембране сенсорных нейронов и эпителиальных клеток, активируются в ответ на широкий спектр физических и химических стимулов, в частности, на повышение

температуры. Из данных криоэлектронной микроскопии известно, что в механизме температурно-опосредованной активации TRPV принимает участие молекула липида, находящаяся в т. н. «ваниллоидном кармане» (VBP) в закрытом состоянии и покидающая его при открытии канала. В TRPV1 данный липид определён как фосфатидилинозитол (PI), в то время как в TRPV3 полученная электронная плотность не позволяет однозначно его идентифицировать. В настоящее время роль данного липида в механизме активации канала остаётся неясной. Цель настоящей работы - установление причины селективности VBP к PI в TRPV1 и роли липидов в механизме температурной чувствительности TRPV.

Методы. Проведено молекулярно-динамическое (МД) моделирование структур TRPV1 (PDB ID 7L2P) и TRPV3 (PDB ID 7MIN) с липидами различных типов, расположенными в VBP: PI, фосфатидилсерина (PS), фосфатидилхолина (PC), фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидилглицерина (PG).

Результаты. Сравнение характеристик распределения электростатического потенциала на поверхности VBP показало больший положительный заряд и его менее гетерогенное распределение в TRPV3 по сравнению с TRPV1, вызванное различиями в остатках в аналогичных положениях: Glu513-His523, Glu570Gln580, Ile703-Arg698 в TRPV1 и TRPV3, соответственно. Анализ полярных контактов липид-VBP показал, что в VBP TRPV1 и TRPV3 липиды наиболее часто взаимодействуют с аналогичными остатками спиралей S3, S4, S4-S5 линкера и TRP спирали, однако, в отличие от TRPV3, в сайте VBP TRPV1 PI и PS также связываются с расположенным на N-линкере Arg409. Расчёт числа водородных связей подтвердил селективность TRPV1 к PI, в то время как в TRPV3 по данному параметру выраженной селективности к определенному типу липидов не наблюдалось.

Выводы. Таким образом, сайты VBP TRPV1 и TRPV3 отличаются по распределению электростатического потенциала и возможности образования полярных контактов, что может определять их селективность к различным липидам. Развитием данной работы является анализ свободной энергии связывания каждого из типов липидов с TRPV1 и TRPV3 и дизайн точечных мутаций, обеспечивающих изменение селективности липидов к VBP и позволяющих в перспективе направленным образом модулировать температурно-опосредованную активацию TRPV.

Работа поддержана грантом РФФ 23-14-00313.

ВХЗ. Промотор гена FOS обладает чувствительностью к одновалентным катионам

А.М. Горбунов (gor2903@mail.ru)¹, Д.А. Федоров¹, Е.А. Климанова¹, О.Д. Лопина¹

¹Кафедра биохимии, Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. В клетках животных концентрация K⁺ на порядок превышает концентрацию Na⁺, однако при некоторых физиологических и патофизиологических процессах соотношение Na⁺/K⁺ может увеличиваться. Во многих типах клеток такое изменение этого параметра увеличивает транскрипцию гена FOS. В литературе имеются противоречивые данные относительно способности изолированного промотора гена FOS обеспечивать чувствительность к одновалентным катионам. Неясен и механизм этой чувствительности. Мы предполагаем, что она может осуществляться через изменение конформации и/или стабильности G-квадруплексов

(G4) – вторичных структур ДНК, расположенных внутри промотора FOS. Известно, что стабильность структур G4 зависит от координации ионов металлов и убывает в ряду $K^+ \rightarrow Na^+ \rightarrow Li^+$. В качестве контроля в наших исследованиях мы использовали ген RPLP0, который не содержит в своем промоторе G4.

Методы. Промоторы генов FOS (от -549 до +155 п.о.) и RPLP0 (от -700 до +295 п.о.) амплифицировали с геномной ДНК клеток HeLa и встраивали при помощи системы рестрикции-лигирования в беспромоторный вектор pеTurboGFP-PRL-dest1. Таким образом, были получены генетические конструкции, кодирующие дестабилизированный флуоресцентный белок TurboGFP, находящийся под управлением промотора FOS или RPLP0.

Клетки НЕК 293Т трансфицировали полученными конструкциями с использованием реагента Lipofectamine 2000 и выдерживали сутки в среде DMEM с концентрацией фетальной бычьей сыворотки 0,1%. Затем клетки подвергали воздействию 1 мкМ уабаина (ингибитор Na, K -АТФазы, который обеспечивает увеличение соотношения Na^+/K^+) или инкубировали в среде, в которой ионы Na^+ были заменены на ионы Li^+ . Транскрипционную активность при каждом воздействии оценивали по интенсивности флуоресценции TurboGFP в отдельных клетках.

Результаты. Увеличение соотношения Na^+/K^+ в НЕК 293Т после инкубации клеток в присутствии 1 мкМ уабаина в течение 3 ч, а также нагрузка клеток ионами Li^+ статистически значимо увеличивали медианное значение флуоресценции TurboGFP под управлением промотора FOS на 21% и на 23% соответственно. Активность контрольного промотора RPLP0 при данных воздействиях не изменялась.

Выводы. Полученные результаты показывают, что промотор FOS обладает чувствительностью к одновалентным ионам металлов. Повышение активности промотора FOS не только при увеличении внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ , но и в условиях нагрузки клеток ионами Li^+ косвенно свидетельствует о потенциальной роли G-квадруплексов в обеспечении такой чувствительности.

БХ4. Исследование локализации ДГОК в ядре и митохондриях методами масс-спектрометрии и иммуноблоттинга

А.А. Емельянова (a_etelyanova_03@mail.ru)¹, В.И. Буник^{2,3}

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

²НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ, Россия, Москва

³Сеченовский Университет, кафедра биохимии, Россия, Москва

Введение. Дегидрогеназы 2-оксокислот (ДГОК) входят в состав комплексов, продуцирующих ацил-КоА, которые используются для ацилирования белков. Ранее механизм участия ДГОК в ацилировании гистонов был неочевиден из-за известной митохондриальной локализации ДГОК. Но в последнее время появились данные о ядерной локализации ДГОК. Цель нашей работы: с помощью масс-спектрометрии (МС) и иммуноблоттинга изучить представленность дегидрогеназ пирувата (ПДГ), 2-оксоглутарата (ОГДГ) и 2-оксоадипата (ОАДГ) и ацилирование белков в субклеточных фракциях.

Методы. Печень гомогенизировали в среде выделения митохондрий и фракционировали методом дифференциального центрифугирования. Обломки

клеток и ядра осаждали в течение 10 минут при 600 g, отбирали супернатант, осаждали митохондрии в течение 5 минут при 15000 g. Супернатант после второго центрифугирования представлял собой цитозольную фракцию. Осадок в обоих случаях дважды промывали средой и центрифугировали при тех же параметрах. Ацилирование и экспрессию белков оценивали Вестерн-блоттингом с использованием первичных антител: к ацетилированию (1:2000, CST 9814), сукцинированию (1:3000, РТМ-401), глутарилрованию (1:2000, РТМ-1151), OGDH (1:2000, РА5-28195), DHTKD1 (1:400, РА5-24208), PDHA (1:1000, CST 3205), маркеру митохондрий COX IV (1:2000, ab153709) - и вторичных антител (1:5000, #P-GAR Iss). Представленность белков по МС оценивали как отношение процента покрытия белка пептидами к его массе. Кластеризацией в R белки были сгруппированы по представленности. С помощью DAVID определены термины, обогащенные в кластерах ДГОК.

Результаты. Вестерн-блоттинг показал, что ацилирование белков 10-17 кДа выше в ядерной фракции, а экспрессия COX IV – в митохондриальной. Ввиду высокой степени ацилирования гистонов и митохондриальной функции COX IV это говорит о специфическом обогащении фракций белками. Иммуноблоттинг выявил экспрессию ДГОК в ядре. Отношение экспрессии ПДГ и ОАДГ (96 кДа) к COX IV выше в ядрах, что доказывает их ядерную локализацию, так как при псевдоядерной локализации из-за загрязнения митохондриями соотношение не различалось бы. МС показала, что отношение представленностей ДГОК и фумаразы – единственного фермента цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), отсутствующего в ядре, также было выше в ядрах. Анализ белков кластеров ДГОК показал в ядрах наивысшее обогащение для термина «ацетилирование», а в митохондриях – «митохондриальный транзит». Термины «метаболические пути» и «ЦТК» более обогащены в митохондриях, а термины метаболизма РНК представлены только в ядерном кластере.

Выводы. Показана ядерная локализация и специфическая ассоциация ДГОК с ядерными белками.

Работа проведена по гостеме AAAA-A19-119042590056-2.

ВХ5. Изменения метаболизма клеток глиобластомы человека при инфекции онколитическим вирусом полиомиелита

М.А. Зенов (martin.zenov@yandex.ru)^{1,2}

¹*Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

²*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория биохимии вирусных инфекций*

Введение. Полиовирус рассматривается как один из онколитических агентов против мультiformной глиобластомы человека (GBM) – одного из наиболее агрессивных видов рака [1]. Одной из стратегий при разработке терапии с использованием онколитических вирусов является поиск средств, способных усиливать онколиз. Успешность этого подхода продемонстрирована в нашей лаборатории на примере вируса Коксаки [2]. Нашей задачей является поиск изменений в метаболизме клетки при инфекции полиовирусом для установления мишеней для фармакотерапии.

Методы. Клеточные линии глиобластомы DBTRG-05MG и U-251MG инфицировались полиовирусом штамма PV2, оценка продуктивности инфекции проводилась иммуноокрашиванием. Уровни клеточных метаболитов анализировали методами ГХ-МС и ВЭЖХ. Интенсивности гликолиза и дыхательной активности митохондрий

измеряли при помощи технологии Seahorse. ОТ-ПЦР в реальном времени позволял сравнивать уровни мРНК метаболических ферментов, участвующих в биосинтезе триглицеридов и ряда других метаболитов. Также производилась оценка противовирусной активности фармакологических ингибиторов некоторых клеточных ферментов и их способности усиливать онколитическое действие вируса после инфекции методом десятикратных разведений вируса и колориметрического анализа.

Результаты. Продемонстрировано, что полиовирус вызывает умеренное повышение уровней биогенных полиаминов и усиливает синтез триглицеридов, жирных кислот и пуриновых нуклеотидов в клетках GBM. Показано, что биогенные полиамины не играют существенной роли в репликации полиовируса, тогда как пируват – продукт гликолиза – необходим для репликации. Ни один из изученных ингибиторов, однако, не усиливал онколитический эффект полиовируса в отношении GBM.

Выводы. Регулируемые вирусом полиомиелита метаболические пути не могут являться мишенями для средств усиления его онколитической активности. Это отличает полиовирус от вируса Коксаки – другого представителя энтеровирусов. Тем не менее, нами планируется дальнейший поиск фармакологических ингибиторов иных биохимических путей, затрагиваемых полиовирусом, а также изучение аналогичных процессов на примере других энтеровирусов.

Работа поддержана грантом РФФ №19-74-10086.

Литература

- [1] Goetz, C., & Gromeier, M. (2010). Preparing an oncolytic poliovirus recombinant for clinical application against glioblastoma multiforme. *Cytokine & growth factor reviews*, 21(2-3), 197-203.
- [2] Vorobyev, P. O., Kochetkov, D. V., Chumakov, P. M., Zakirova, N. F., ZotovaNefedorova, S. I., Vasilenko, K. V., Ivanov, A. V. (2022). 2-Deoxyglucose, an Inhibitor of Glycolysis, Enhances the Oncolytic Effect of Cocksackievirus. *Cancers*, 14(22), 5611.

БХ6. Исследование регуляции АТФазной активности FOF1-АТФ-синтазы *Bacillus subtilis*

В.М. Зубарева (zubareva.valeriaa@gmail.com)^{1,2}, А.С. Лапашина^{1,2}, Б.А. Фенюк²

¹*Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва*

²*НИИ ФХБ им. Белоцерского МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. H⁺-FOF1-АТФ-синтаза – важнейший фермент, катализирующий синтез АТФ, сопряженный с протонным транспортом, за счет протондвижущей силы (*pmf*). Фермент также способен и к гидролизу АТФ, который приводит к появлению на мембране *pmf*. АТФазная активность фермента подвержена неконкурентному ингибированию комплексом MgАДФ. Для ряда бактерий известно также ингибирование АТФазной активности С-концом субъединицы. Взаимодействие двух типов регуляции точно не установлено: часть авторов считает, что С-концевой домен -субъединицы противодействует АДФ-ингибированию, другие, напротив, предполагают, что оба типа ингибирования поддерживают друг друга.

Методы. Целью работы было изучение взаимодействия -ингибирования и АДФ-ингибирования в АТФ-синтазе *Bacillus subtilis*. Исследования проводились на четырех препаратах комплекса FOF1 в составе протеолипосом: фермента дикого типа, фермента с делецией С-концевого домена субъединицы, фермента с ослабленным

АДФ-ингибированием (β Q259L) и фермента, несущего обе мутации (Δ C + β Q259L). Измерения проводились как в присутствии АТФ-регенерирующей системы, так и с помощью метода, который позволяет производить измерения в присутствии АДФ. Также измерения были проведены в присутствии хлорид- и сульфат-анионов.

Результаты. Присутствие сульфата в буферной системе снижает АТФазную активность ферментов дикого типа и Δ C, а также повышает чувствительность всех белков к азиду натрия (азид инактивирует фермент, запирая его в АДФ-ингибированном состоянии). Это позволяет предположить, что сульфат усиливает АДФ-ингибирование АТФ-синтазы *B. subtilis*.

При измерении в АТФ-регенерирующей системе на фоне микромолярных концентраций АТФ АТФазная активность фермента дикого типа оказалась выше, чем фермента Δ C, что позволяет предположить, что субъединица может оказывать активирующее действие на АТФ-синтазу *B. subtilis*. Однако в присутствии высоких концентраций АТФ фермент Δ C обладал более высокой АТФазной активностью, чем фермент дикого типа. Измерения в присутствии АДФ показали, что он ингибирует АТФ-синтазу дикого типа сильнее, чем фермент, лишенный регуляторного домена субъединицы.

Выводы. Полученные нами данные позволяют предположить, что эффект субъединицы АТФ-синтазы *B. subtilis* на АДФ-ингибирование зависит от концентрации АТФ в среде. Вместе с этим, в живой клетке в присутствии физиологических концентраций АТФ субъединица, вероятно, усиливает АДФ-ингибирование.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-14-00268-П.

ВХ7. Увеличение внутриклеточного содержания Li^+ влияет на экспрессию генов и сигнальные каскады в клетках эндотелия

О. Е. Квитко (kvitko_olya0218@mail.ru)¹, Д. А. Федоров¹, Е. А. Климанова¹, О. Д. Лопина¹

¹Кафедра биохимии, Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова,

Россия, Москва

Введение. При некоторых заболеваниях изменяются концентрации ионов Na^+ и K^+ в клетке, что влияет на экспрессию ряда генов. Среди таковых можно выделить Na^+/K^+ -чувствительные гены, на экспрессию которых одновалентные катионы влияют независимо от сигнальных каскадов, запускаемых Ca^{2+} . Li^+ также является биологически важным одновалентным катионом, влияющим на внутриклеточные сигнальные пути. В настоящей работе представлены данные о том, как увеличение внутриклеточной концентрации Li^+ может изменять экспрессию генов в культуре эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES).

Методы. Клетки HUVES инкубировали в присутствии 40 мМ Li^+ или Na^+ , а также 0,5–2 мкг/мл монензина в течение 1,5 ч. Внутриклеточное содержание Na^+ , K^+ , Li^+ оценивали методом атомно-абсорбционной спектроскопии. Изменение экспрессии генов Fos, Jun, Egr1, Muc, Ptgs2, Atf3 определяли методом ПЦР в реальном времени. Уровень фосфорилирования ERK1/2, p38MAPK, CREB исследовали методом вестерн-блота.

Результаты. Инкубация HUVES в присутствии 40 мМ внеклеточного Li^+ в течение 1,5 ч вызывала накопление в клетке 230 нмоль/мг белка Li^+ . Сопоставимое изменение

внутриклеточного содержания Na^+ достигалось в присутствии 1,2 мкг/мл монензина. Накопление Li^+ в клетке приводило к увеличению экспрессии генов *Fos* и *Egr1* и снижению – *Jun* и *Myc*, при этом не влияло на экспрессию *Ptgs2* и *Atf3*. Повышение внеклеточной концентрации Na^+ снижало экспрессию *Jun* и увеличивало экспрессию *Atf3*. Накопление Li^+ в клетке повышало уровень фосфорилирования ERK1/2, p38MAPK, CREB. Увеличение уровня фосфорилирования ERK1/2 детектировали также при повышении внеклеточной концентрации Na^+ , а уровень фосфорилирования CREB – при увеличении как внеклеточного, так и внутриклеточного содержания Na^+ .

Выводы. Мы установили, что Li^+ вызывает изменение экспрессии генов *Fos*, *Jun*, *Egr1*, *Myc* воздействует на сигнальные пути с участием ERK1/2, p38MAPK и CREB. Кроме того, мы показали, что действие Li^+ на HUVEC отлично от действия Na^+ и K^+ .

БХ8. Получение рекомбинантного α -синуклеина человека в бактериальной системе экспрессии

А.В.Константинова (a.v.konstantinova@mail.ru)¹

¹*Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Альфа-синуклеин - белок человека, локализующийся в нервной системе. Главным свойством данного белка является его склонность к амилоидной агрегации. При различных нейродегенеративных заболеваниях, в первую очередь болезни Паркинсона, амилоидные агрегаты альфа-синуклеина откладываются в головном мозге. Для поиска лекарственных средств против них следует изучить возможные способы ингибирования агрегации альфа-синуклеина. Целью данной работы является улучшение протокола получения чистого препарата рекомбинантного альфа-синуклеина человека.

Методы. Для трансформации использовали штамм BL21 (DE3) бактерий *E. coli*. В качестве вектора была взята плаزمида pET33b(+), в которую был встроен ген *SNCA*, ответственный за экспрессию белка α -синуклеина. С помощью сайт-направленного мутагенеза мы встроили стоп-кодон TAA вместо использованного ранее TGA, в ряде случаев считывавшемся как триптофан и тем самым удлиняющем полученный белок на 783 кДа. Для очистки использовали кислотное осаждение 9% HCl. Восстанавливали физиологический pH. Далее проводили гидрофобную хроматографию на носителе Phenyl Sepharose 6 Fast Flow. Буфер для внесения использовали 50 mM Bis-Tris 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH = 7.0, буфер для элюции 50 mM Bis-Tris pH = 7.0. Готовый белок высаливали сульфатом аммония до 40% насыщения.

Результаты. В результате был получен очищенный рекомбинантный белок альфа-синуклеин человека без аббератного рекомбинантного белка, ранее экспрессируемого в данной бактериальной системе из-за неправильного считывания стоп-кодона. Использование гидрофобной хроматографии полностью очистило белок от примесей.

Выводы. Ошибка в считывании стоп-кодона TGA в *E.coli* может приводить к экспрессии абберантного рекомбинантного белка, поэтому следует избегать его использования в данной экспрессионной системе и заменять на другие стопкодоны, например TAA, использование которого дает правильный результат.

БХ9. Механизм влияния химических шаперонов аргинина и лизина на тепловую агрегацию бычьего сывороточного альбумина

О. В. Короленко (olkoroltkd@gmail.com)^{1,2}, В.А. Борзова¹

¹Лаборатория структурной биохимии белка, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, Москва

²Факультет химической технологии и биотехнологии, Московский политехнический университет, Россия, Москва

Введение. Изучение агрегации белков является важной задачей современной биотехнологии. Бычий сывороточный альбумин (БСА) - популярный модельный белок для изучения агрегации. Химические шапероны (ХШ), например аминокислоты аргинин (Арг) и лизин (Лиз) – низкомолекулярные соединения, подавляющие агрегацию.

Методы. В работе использовался метод динамического светорассеяния, с помощью которого была изучена кинетика тепловой агрегации УФ-облученного БСА при 50°C и БСА при 70°C. Также было изучено влияние на кинетику агрегации ионной силы, создаваемой NaCl в концентрациях, соответствующих таковым для Арг и Лиз. Кроме того, применялись методы флуоресцентной спектроскопии (собственной флуоресценции белка и флуоресцентного красителя – АНС для анализа гидрофобных взаимодействий).

Результаты. Показано, что низкие концентрации ХШ (до 300 мМ Лиз и 400 мМ Арг для УФ-БСА и до 500 мМ Лиз/Арг для БСА) вызывают ускорение агрегации. При повышении концентрации агрегация подавляется. Показано, что NaCl ускоряет агрегацию БСА в концентрациях до 1 М, а УФБСА – до 500 мМ. При изучении влияния Арг/Лиз на фоне постоянной ионной силы 1 М, было установлено, что в концентрациях до 300 мМ они ускоряют агрегацию БСА; агрегация УФ-БСА подавляется при любых концентрациях Арг/Лиз.

При изучении собственной флуоресценции БСА и УФ-БСА в присутствии Арг/Лиз, NaCl и их смесей было установлено, что ХШ и NaCl не оказывают влияния на положение максимума спектра. Наиболее выраженное влияние на интенсивность флуоресценции наблюдается при концентрации 50 мМ для всех добавок. Применение флуоресцентного красителя АНС показало, что эффекты Арг/Лиз в отсутствие и присутствии NaCl не различаются.

Выводы. Показано ускорение агрегации БСА и УФ-БСА низкими концентрациями ХШ. Арг/Лиз не оказывают выраженного влияния на структуру БСА, основное взаимодействие наблюдается при концентрации Арг/Лиз 50 мМ. Одним из механизмов влияния ХШ на агрегацию БСА является гидрофобное взаимодействие с молекулами нативного и облученного белка, не зависящее от присутствия NaCl.

БХ10. Получение и структурно-функциональная характеристика гиспидин-3-гидроксилазы из *Armillaria ostoyae*

Д. А. Кузнецова (*kuznecovada@ty.msu.ru*)^{1,2}, Т. В. Чепурных¹, А. Ю. Гороховатский¹

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

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Биоломинесценция высших грибов обеспечивается циклом кофейной кислоты. В данном метаболическом пути гиспидин-3-гидроксилаза (НЗН) катализирует реакцию окисления гиспидина молекулярным кислородом с образованием грибного люциферина, в ходе реакции также окисляется одна молекула NAD(P)H. Данный фермент относится к классу А флавиновых монооксигеназ и содержит FAD в качестве кофактора. Установление трехмерной структуры НЗН позволит выяснить механизм реакции и установить аминокислотные остатки, участвующие в катализе для дальнейшего улучшения биоломинесцентной системы грибов.

Методы. В ходе работы методом модульного клонирования была создана генетическая конструкция для экспрессии НЗН в клетках *P. pastoris* и разработан метод хроматографической очистки для получения гомогенного препарата как холоформы, так и апоформы фермента. Измерение биохимических констант проводили с использованием ВЭЖХ.

Результаты. Чистота полученного препарата НЗН составила более 95% по данным SDS-электрофореза. По результатам гель-фильтрации фермент является мономером. Константа Михаэлиса для гиспидина составила 5,6 мкМ, каталитическая константа 189 мин⁻¹. Были получены кристаллы НЗН и определена пространственная структура с разрешением 3,8 А. Установлены остатки, участвующие в связывании кофактора и определена степень гомологии третичных структур НЗН и ее ближайших гомологов.

Выводы. Для установления детального механизма катализа необходима структура с более высоким разрешением, поэтому в настоящее время продолжают работы по оптимизации условий кристаллизации и получению кристалла НЗН с одним из субстратов - гиспидином.

БХ11. Экспрессия и ацетилирование фактора транскрипции с-Мус в нервных клетках после фототромботического инсульта

А.Е. Куницына (*akunicyna@sfn.edu.ru*)¹, С.А. Батальщикова¹, Е.А. Русс¹, В.В. Гузенко¹

¹Лаборатория «Молекулярная нейробиология» ЮФУ, Россия, Ростов-на-Дону

Введение. Активность и стабильность фактора транскрипции с-Мус, играющего роль в синтезе белков, может регулироваться некоторыми посттрансляционными модификациями, в частности ацетилированием. Но на данный момент имеется недостаточно данных о его влиянии на работу с-Мус в нейронах в условиях ишемии. Таким образом, целью данной работы стало исследование экспрессии с-Мус и характера его ацетилирования в нервных клетках перифокальной зоны фототромботического инсульта (ФТИ) коры мозга крыс.

Методы. При выполнении работы были использованы следующие методы:

ФТИ, молекулярно-динамическое моделирование (МДС), вестерн-блот анализ и иммуногистохимия.

Результаты. После ФТИ наблюдалось увеличение уровня ацетилированного с-Мус в цитоплазме по лизину 148, но не по лизину 323. Результаты МДС выявили ключевую роль лизина 148 в формировании пространственной структуры данного белка. Кроме его дестабилизации, ацетилирование также препятствует проникновению с-Мус в ядро и, вероятно, регулирует его взаимодействие с белками-партнерами, оказывая негативное влияние на его проапоптотическую активность.

Было показано, что после ФТИ фактора транскрипции с-Мус подвергался ацетилированию ацетилтрансферазами p300 и, в меньшей степени, PCAF, как в ядрах, так и в цитоплазме нейронов. SIRT2 деацетилировал с-Мус преимущественно по лизину 148 в цитоплазме, а HDAC2 – по лизину 323 в ядрах нервных клеток.

Выводы. Таким образом, поиск стратегий, направленных на регулирование активности p300 или SIRT2, приводящее к ацетилированию с-Мус по лизину 148, может оказаться перспективным для разработки средств, повышающих выживаемость нейронов в условиях ишемии.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018.

БХ12. Структурные и функциональные свойства немышечных изоформ тропомиозина Trpm1.8 и Trpm1.9

К.К. Лапшина (lapshina.2003@gmail.com)^{1,2}, В.В. Нефёдова², А.М. Матюшенко², С.Г. Роман²

¹МГУ им. М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики, Россия, Москва

²ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, Москва

Введение. Тропомиозин (Trpm) - типичный α -спиральный белок структуры coiled-coil, образующий непрерывную полимерную цепь вдоль актинового филамента. В настоящем исследовании были получены малоизученные цитоплазматические изоформы Trpm1.8 и Trpm1.9, имеющие различия в шестом экзоне. Помимо этого были проведены исследования для белков, имеющих аланин-сериновую N-концевую модификацию (AS), которая имитирует N-концевое ацетилирование Trpm, с целью выяснить, оказывает ли она влияние на свойства белков.

Методы. В работе были использованы методы дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), спектроскопии кругового дихроизма (КД), вискозиметрии, высокоскоростного центрифугирования и светорассеяния.

Результаты. С помощью методов КД и ДСК было установлено, что тепловая денатурация молекулы Trpm носит обратимый характер. На дифференциальных кривых плавления КД при 222 нм наблюдался ряд переходов при 40 °С и 60 °С для Trpm1.8, 45 °С и 60 °С – для Trpm1.9, что свидетельствует о наличии элементов структуры с кооперативным плавлением. Более детальные данные о доменной структуре белков были получены методом ДСК. После деконволюции кривых избыточного теплопоглощения для обеих изоформ были определены три домена – участки в молекуле Trpm, которые денатурировали независимо друг от друга. Измерения, проведенные методом ДСК и КД показали схожие результаты: Trpm1.9 является более термостабильной изоформой с равномерным характером плавления, тогда

как Trpm1.8 менее стабильна и имеет хорошо различимый домен при температуре 55 °С. Стабильность комплекса Trpm-F-актин оценивали по падению светорассеяния. Изоформа тропомиозина Trpm1.9 имеет более высокую температуру диссоциации комплекса с F-актином, чем изоформа Trpm1.8 (46,2 °С и 44,4 °С, соответственно). Эти температуры не совпадают с температурами плавления calorimetрических доменов, что может свидетельствовать о значительном влиянии параметров аффинности и силы концевых взаимодействий Trpm на устойчивость комплекса. Концевые взаимодействия молекул тропомиозина друг с другом были изучены при помощи метода вискозиметрии. Показатель вязкости был выше у изоформы Trpm1.9, однако обе изоформы обладают аномально высокой вязкостью. Это свойство может способствовать быстрому образованию протяженных нитей на поверхности актинового филамента и защите его от деполимеризации.

Выводы. Изоформы Trpm1.8 и Trpm1.9 отличаются только шестым экзоном, следовательно, за дестабилизацию структуры отвечает экзон 6b. Структура центрального шестого экзона оказывает серьезное влияние на концевые взаимодействия между димерами Trpm и вязкость раствора белка. Можно сделать вывод, что для структуры Trpm характерны дальнедействующие эффекты, при которых центральная часть молекулы влияет на ее N- и C-концевые участки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-74-10106.

БХ13. Влияние кардиотонических стероидов на вызванное бета-амилоидом увеличение активности Src-киназы и изменение уровня APP в клетках нейробластомы SH-SY5Y

Д. Р. Лисицкий (lisitskiivulpes@gmail.com)¹, М. А. Стрелкова², Ф. А. Филонов^{1,2}, И. Ю. Петрушанко²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²ФГБУН институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Россия, Москва

Введение.

Na/K-АТФаза – белок, критически важный для поддержания мембранного потенциала клеток. Кроме того, он выполняет рецепторную функцию, связывая физиологические лиганды – кардиотонические стероиды (КТС) – и активируя внутриклеточные сигнальные каскады. Помимо КТС, с Na/K-АТФазой способен взаимодействовать бета-амилоид Aβ42 – ключевой пептид патогенеза болезни Альцгеймера, образующийся в результате ограниченного протеолиза белкапредшественника амилоида (APP). Взаимодействие КТС или Aβ42 с Na/K-АТФазой приводит к активации ассоциированного с ней белка-партнера – Src-киназы, которая вовлечена в регуляцию процессинга APP. При этом, характер влияния КТС на амилоид-опосредованную активацию Src не известен.

Цель. Оценить влияние КТС на опосредованную амилоидом активацию Srcкиназы и изменение уровня экспрессии APP в дифференцированных и недифференцированных клетках нейробластомы SH-SY5Y.

Методы.

Клетки нейробластомы человека линии SH-SY5Y культивировали в покрытых

коллагеном 6-луночных планшетов. Часть клеток подвергали нейрональной дифференцировке с использованием ретиноевой кислоты и фактора BDNF. Была оценена жизнеспособность клеток через 24 часа инкубации с различными КТС (уабаином, дигоксином, буфалином и маринобуфагенином). Была выбрана концентрация КТС, не приводящая к токсическому эффекту. Дифференцированные и недифференцированные клетки инкубировали с КТС в течение 30 минут, после чего добавляли Аβ42 и инкубировали еще 30 минут. Уровень APP, Src-киназы и ее активированной, фосфорилированной по Tyr416, формы (pSrc) оценивали методом Вестерн-блоттинга.

Результаты.

Оптимальная концентрация КТС, вызывающая клеточный ответ, но не обладающая цитотоксичностью, составила 100 нМ. Установлено, что в данной концентрации буфалин и дигоксин снижают опосредованное Аβ42 повышение уровня экспрессии APP. Анализ отношения pSrc/Src позволил выявить, что КТС, наиболее эффективно предотвращающий активацию Src-киназы, – дигоксин.

Выводы.

Показано снижение опосредованной бета-амилоидом активации Src киназы и уровня экспрессии APP в клетках нейроblastомы SH-SY5Y под действием различных кардиотонических стероидов.

ВХ14. Разнообразие форм гомологов каротиноидсвязывающего белка ASTAP

Д.А. Лунегова (*dasha-lun@mail.ru*)^{1,2}, Ю.Б. Слонимский¹, Н.Н. Случанко¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

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

Введение. Каротиноиды - гидрофобные пигменты, которые могут быть стабилизированы в водной фазе в комплексе с каротиноид-связывающими белками. Астаксантин-связывающий белок (AstaP) из зеленых микроводорослей [1] имеет широкий репертуар связываемых лигандов [2]. За связывание каротиноидов ответственен центральный фасциклиновый домен (FAS), однако не все FAS домены способны связывать каротиноиды [2]. В семействе Scenedesmaceae распространены две формы гомологов: AstaP-orange (AstaPo) и AstaP-pink (AstaPp), отличающиеся спектральным сдвигом и формой спектра, при этом хорошо описан только AstaPo1, для которого получена структура (PDB 8C18). Мы предположили, что существуют и другие формы AstaP, в том числе и за пределами семейства *Scenedesmaceae*.

Методы. Биоинформатический анализ выявил несколько кандидатов гомологов AstaP, функциональность которых была проверена нами по способности образовывать водорастворимые холоформы при экспрессии в зеаксантин (ZEA) продуцирующих клетках *E. coli*. Синтетические конструкции с отщепляемым тагом были экспрессированы и очищены с помощью металлохелатной и гельхроматографии. Связывание каротиноида с белком подтверждали путем детекции спектра поглощения каротиноида в пределах пика элюции мономерного белка. Идентичность связанного ZEA подтверждали методом ВЭЖХ.

Результаты. Получены рекомбинантные холоформы AstaPp1, а также двухдоменного

AstaPo2, с ZEA. Впервые показано, что оба FAS-домена AstaPo2 способны связывать ZEA, причем их спектры поглощения отличаются от таковых у AstaPo1-FAS. Впервые идентифицированы функциональные FAS-домены и у других семейств водорослей - *Selenastraceae* и *Coccomyxaceae*. Данные каротинопротеины обладают смешанными спектральными характеристиками, не позволяющими однозначно отнести их ни к orange, ни к pink, и, по-видимому, являются новыми формами AstaP. Гомолог из зелёной водоросли *Chlorella variabilis* оказался нефункциональным, что может означать отсутствие AstaP-подобных белков у *Chlorellaceae*.

Выводы. Обнаружение новых гомологов AstaP вне семейства *Scenedesmaceae* расширяет диапазон известных спектральных форм и открывает путь для дальнейшей идентификации структурных элементов, обуславливающих каротиноид-связывающие особенности белков AstaP.

Литература

1. Kawasaki, S., Yamazaki, K., Nishikata, T. et al. (2020) Photooxidative stress-inducible orange and pink water-soluble astaxanthin-binding proteins in eukaryotic microalga. *Commun Biol* 3, 490.
2. Kornilov, F.D., Slonimskiy, Y.B., Lunegova, D.A. et al. (2023) Structural basis for the ligand promiscuity of the neofunctionalized, carotenoid-binding fasciclin domain protein AstaP. *Commun Biol* 6, 471.

БХ15. Получение рекомбинантного одноцепочечного варибельного фрагмента ингибиторного антитела к RAPP-A и исследование его иммунохимических свойств

А.В. Макеева (arinam200231@gmail.com)¹, А.А. Мамаева¹, Д.А. Гуцеваров¹, Д.В. Серебряная¹

¹Кафедра биохимии, биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Pregnancy-Associated Plasma Protein A (PAPP-A) представляет собой сериновую металлопротеазу, локализованную на поверхности клетки. Функция PAPP-A заключается в расщеплении белка IGFBP-4 по специфическому сайту и регуляции биодоступности инсулиноподобного фактора роста (IGF) высвобождением его из комплекса с IGFBP-4. При моделировании патологических состояний на различных клеточных культурах наблюдается усиление протеолиза IGFBP-4, обусловленного активностью PAPP-A в сердечной и нервной ткани. Однако, специфичность данного протеолиза не была подтверждена, ввиду отсутствия специфических ингибиторов PAPP-A. Таким образом, целью данной работы являлось получение рекомбинантного одноцепочечного варибельного фрагмента ингибиторного антитела, потенциально способного к деактивации к PAPP-A, и исследование его иммунохимических свойств.

Методы. Молекулярно-генетические конструкции для экспрессии рекомбинантных одноцепочечных фрагментов антител 1-41 VH-VL и 1-P8 VL-VH были получены путем встраивания последовательности ScFv в экспрессионный вектор pET23a(+) по рестриктивным сайтам NdeI и XhoI. Целевые белки были экспрессированы в штамме *E.coli* Rosetta 2(DE3)pLysS при 37°C в течение 3 часов. Экспрессия ScFv была подтверждена методами белкового электрофореза и иммуноблоттинга с использованием антител, специфичных к Histag. Иммунохимическую активность очищенных белков анализировали методом ФИА «сэндвич»-типа с использованием различных пар антител, распознающих PAPP-A.

Результаты. Большая часть целевых белков обнаруживалась во фракции телец включения, после чего была проведена ренатурация по методу [Wibbenmeyer, 1999] и очистка методом аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе. Выход 1-41 VH-VL и 1-P8 VL-VH составил 2,3 мг и 2,4 мг с литра культуры, соответственно. Показано, что ScFv-фрагмент 1-41 не проявлял иммунохимическую активность в отношении PAPP-A в парах с антителами 7A6 и 10E1. Причем, увеличение плотности посадки 1-41 на подложку не увеличивало интенсивность сигнала. ScFv1-P8, напротив, обладал иммунохимической активностью в отношении PAPP-A, в паре с 7A6, но не с 10E2.

Выводы. Таким образом, ScFv-фрагмент 1-P8 в паре с антителом 7A6 может быть использован для детекции PAPP-A методом ФИА-”сэндвич”-типа и, потенциально для ингибирования протеолиза IGFBP-4 протеазой PAPP-A.

БХ16. Изучение динамики экспрессии Т-кадгерина в процессе адипогенной дифференцировки

Д.Д. Даушев (denis.daushev@gmail.com)^{1,2}, Л.Ж. Мамешева^{1,2}

¹Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Лаборатория механизмов морфогенеза и репарации тканей Факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Адипогенная дифференцировка – последовательные внутриклеточные каскады, в ходе которых преадипоциты превращаются в зрелые адипоциты. В процессе участвуют регуляторы, одним из которых, по предварительным данным, является Т-кадгерин – рецептор белка адипонектина, гормона жировой ткани, который секретируют зрелые адипоциты. В литературе есть данные о низком количестве мРНК Т-кадгерина в зрелых адипоцитах, однако динамика изменения количества Т-кадгерина и его роль в процессе дифференцировки мало изучены.

Цель работы – изучить зависимость количества экспрессируемого Т-кадгерина на разных этапах адипогенной дифференцировки на модели культуры преадипоцитов.

Методы. В исследованиях использовались клетки линии эмбриональных фибробластов мыши – 3T3, коммитированных в преадипоциты – культура 3T3-L1. Адипогенная дифференцировка индуцировалась путем добавления индукторов дифференцировки в питательную среду в день 0 (Д-0). В Д-0, Д-3, Д-7, Д-10 и Д-14 готовили клеточные лизаты для получения образцов для последующего проведения РААГ электрофореза в денатурирующих условиях и вестернблоттинга. Для количественной оценки содержания Т-кадгерина в полученных лизатах применялось окрашивание антителами к Т-кадгерину и окрашивание антителами на клеточный актин для выравнивания и нормирования по количеству внесенного лизата на каждый день дифференцировки.

Результаты. По полученным данным количество Т-кадгерина при дифференцировке клеток 3T3-L1 изменяется, что подтвердилось количественной оценкой сигнала иммуноокрашивания при вестерн-блоттинге путем измерения его интенсивности.

Выводы. В дальнейших исследованиях нами будет продолжена эта работа, в том числе для получения клонов клеток преадипоцитов 3T3-L1 с подавлением экспрессии Т-кадгерина для проверки полученных результатов.

Исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда #23-1100205 Биоинформационные исследования новых механизмов регуляции процессов морфогенеза жировой ткани с участием Т-кадгерина

БХ17. Изменение уровня экспрессии гена *GAD1* глутаматдекарбоксилазы в листьях кукурузы в условиях гипоксического стресса

П.П. Москвина (*polinamoskvina2001@gmail.com*)¹, Г.Б. Анохина¹

¹Медико-биологический факультет ВГУ, Россия, Воронеж

Введение. Изучение механизмов приспособления организмов к изменяющимся условиям среды важно для решения различных практических задач. Способность растений произрастать в обедненной кислородом среде связана с формированием целого комплекса анатомо-морфологических и физиолого-биохимических приспособлений. Глутаматдекарбоксилаза (ГДК, L-глутамат-1-карбоксилаза К.Ф. 4.1.1.15) катализирует превращение глутамата γ -аминомасляную кислоту. Данный фермент является ключевым в ГАМК-шунте – обходном пути цикла Кребса, который активируется при различных стрессах. В геноме кукурузы ГДК кодируется тремя генами: *GAD1*, *GAD2* и *GAD3*. Основным негативным фактором является гипоксия. Исходя из этого, целью данной работы было выяснение изменения транскрипционной активности гена *GAD1* в листьях кукурузы в условиях низкого уровня кислорода.

Методы. Постановка гипоксического стресса: 10-12 дневные проростки кукурузы (*Zea mays L.*, сорт Воронежская 76), выращенные гидропонным способом при 25°C, были помещены в разные вакуум-эксикаторы: в первый (контрольная группа) непрерывно осуществлялся приток кислорода воздуха, во второй (опытная группа) в течение суток подавался азот со средней скоростью 17 см³/сек (содержание кислорода в баллоне с азотом составляло $\leq 0,5\%$). Получение суммарной РНК: использовался метод выделения путем фенол-хлороформной экстракции с добавлением в среду сильного денатурирующего агента – гуаниднотиоционата. Получение кДНК для ПЦР: проводили реакцию обратной транскрипции, используя в качестве матрицы выделенную ранее суммарную РНК. Применялся метод с использованием набора MMLV-RT Kit (ЗАО «Евроген») в соответствии с протоколом производителя. ПЦР в реальном времени проводили на приборе LightCycler 96 «Roche», применив в качестве красителя SYBR Green. Амплификация осуществлялась по параметрам: предварительная денатурация – 95°C, 10 мин; проведение 35 циклов, включающих стадии: 95°C – 20 сек; 58°C – 20 сек; 72°C – 20 сек; финальная элонгация 10 мин – 72°C. Количественный контроль проводили с использованием ген-специфических праймеров к генам домашнего хозяйства (факторы элонгации Ef-1 α). В качестве праймеров к генам ГДК были использованы специфические праймеры к *GAD1*.

Результаты. Анализ относительного уровня транскриптов гена *GAD1* в листьях кукурузы показал, что инкубация проростков кукурузы в гипоксических условиях вызывает увеличение уровня мРНК исследуемого гена начиная с первого часа стрессового воздействия. Максимум концентрации мРНК зарегистрирован на 3 час эксперимента, и превышает контрольные значения в 1.6 раз. Однако, на 6 час эксперимента было отмечено снижение относительного уровня транскриптов исследуемого гена. Спустя сутки эксперимента уровень транскриптов гена *GAD1* были ниже контрольных значений более чем в 1.6 раза.

Выводы. Таким образом, мы можем говорить о том, что в условиях гипоксии увеличение ферментативной активности ГДК в первые часы эксперимента связаны

с увеличением транскрипционной активности гена *GAD1*. Возможно, в регуляции данного энзима в дальнейшем принимают участие другие гены семейства *GAD*. Также не исключено, что регуляция ГДК-активности после 24 часов осуществляется на биохимическом уровне за счёт изменения уровня метаболитов.

ВХ18. Получение рекомбинантной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы человека в бактериальной системе экспрессии, определение ее удельной активности и температуры плавления

Д. К. Ковалева (kovdinnk@gmail.com)¹, Р. А. Оганов^{1,2}

¹Кафедра биохимии, Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Лаборатория белков гормональной регуляции, институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

Введение. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) представляет собой фермент, основная функция которого заключается в катализе реакции присоединения неорганического фосфата к глицеральдегид-3-фосфату с образованием 1,3-бисфосфоглицерата. В данной работе мы экспрессировали рекомбинантную ГАФД, содержащую His-таг на N- или C-конце в *E. coli*, проводили очистку помощью металл-аффинной хроматографии и исследовали ее ферментативные, иммунохимические и термодинамические свойства.

Методы. В штамме *Rosetta2(DE3)pLysS* экспрессировали 2 генно-инженерные конструкции, содержавшие последовательности, кодирующие 6 дополнительных остатков гистидина на 5'- и 3'-конце целевого гена. Очистку фермента проводили методом металл-аффинной хроматографии. Полученные препараты белков хранили в фосфатно-солевом буфере, содержавшем 70% от нас. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Для определения удельной активности и константы Михаэлиса фермента проводили измерение оптической плотности пробы при 340 нм в реакционном буфере с добавлением субстратов реакции NAD^+ и 3-ФГК. Для определения температуры плавления использовали метод дифференциальной сканирующей флуориметрии.

Результаты. Получены препараты двух вариантов ГАФД с чистотой более 90%. Измеренная удельная активность составила: $(\text{His})_6\text{ГАФД}$ – 70 мкмоль/мин*мг, $\text{ГАФД}(\text{His})_6$ – 65 мкмоль/мин*мг. Удельная активность эндогенного ГАФД кролика, использованного в качестве стандарта, составила 50 мкмоль/мин*мг. Константа Михаэлиса для препарата $(\text{His})_6\text{ГАФД}$ составила 12 мкМ по NAD^+ и 66 мкМ по 3-ФГА. Получили концентрационную зависимость температуры плавления ГАФД от NAD^+ . Также определили константу диссоциации по NAD^+ по методу [1], которая составила $-5 \cdot 10^{-7}$ М.

Выводы. Были получены две молекулярно-генетические конструкции с последовательностью гистидинового тага на 5'- и 3'-конце. Чистота полученных рекомбинантных ГАФД человека с гистидиновым тагом на N- и C-конце составила более 90%. Удельная активность частично очищенного препарата рекомбинантной ГАФД человека составила для $(\text{His})_6\text{ГАФД}$ 70 мкмоль/мин*мг и 65 мкмоль/мин*мг для $\text{ГАФД}(\text{His})_6$. Константа Михаэлиса рекомбинантного белка $(\text{His})_6\text{ГАФД}$ по NAD^+ составила 12 мкМ, по 3-ФГА 66 мкМ, что сопоставимо с данными, полученными в работах других авторов для эндогенного белка [2].

Литература

1. Bhayani JA, Ballicora MA. Determination of dissociation constants of proteinligands by thermal shift assay. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 Jan.
2. Barinova KV, Eldarov MA, Khomyakova EV, Muronetz VI, Schmalhausen EV. Isolation of recombinant human untagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *E. coli* producer strain. *Protein Expr Purif.* 2017 Sep.

БХ19. TolC-содержащие помпы множественной лекарственной устойчивости влияют на МИК антибиотиков, используемых в ветеринарии

Д. Огирь (*denis.charushev@gmail.com*)¹, П.А. Назаров¹

¹НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Изучение физиологии развития резистентности у бактерий – один из подходов, потенциально способных приблизить человечество к решению проблемы суперрезистентных штаммов. Помпы МЛУ – белковые насосы, выводящие из клетки ксенобиотики, метаболиты, сигналы чувства кворума, участвуют в образовании биоплёнок, служат местом прикрепления бактериофагов. Эти насосы обеспечивают неспецифическое выведение из клетки антибиотиков, тем самым внося вклад в выживание колонии бактериальных клеток [1]. В данной работе была проведена количественная оценка функционирования TolC-содержащих помп у *E.coli* при выведении тилозина, метронидазола, энрофлоксацина, левофлоксацина и окситетрацилина, за счёт сравнения МИК антибиотиков у дикого типа и делеционного по TolC мутанта *E.coli*.

Методы. В данной работе использовался стандартный метод двойных разведений. Бактерии выращивались в стандартной жидкой среде LB объёмом 200 мкл в 96-луночной планшете с добавлением антибиотиков, с температурой 37 °С в течение 24 часов. Штаммы *E.coli* - дикий тип MG1655 и делеционный мутант по белку TolC. Антибиотики – «Тилозин 50», «Метронид 50», «Байтрил», «Лексофлон», «Нитокс 200» производителя «NITA-FARM».

Результаты. МИК выражены в мг/мл:

WT:

Тилозин - 1,190

Метронидазол - 2,380

Энрофлоксацин - $4,761 \cdot 10^{-5}$

Левофлоксацин - $1,046 \cdot 10^{-4}$ Окситетрацилин - $9,523 \cdot 10^{-4}$

Δ TolC:

Тилозин - 0,609

Метронидазол - 1,219

Энрофлоксацин - $2,439 \cdot 10^{-5}$

Левофлоксацин - $7,143 \cdot 10^{-5}$

Окситетрацилин - $4,878 \cdot 10^{-5}$

Выводы. Видно, что делеция гена TolC, и, как следствие, остановка синтеза белка TolC приводит к снижению МИК вышеназванных антибиотиков, что доказывает участие TolC-содержащих помп в процессе выведения этих антибиотиков. Необходимо более детальное исследование каждой TolC-содержащей помпы. Это позволит оценить вклад каждой конкретной помпы на выведение того или иного антибиотика, что

в теории позволит проводить таргетное воздействие на конкретные насосы для предотвращения выживания бактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-15-00099

Литература

1. Nazarov, Pavel A. 2022. «MDR Pumps as Crossroads of Resistance: Antibiotics and Bacteriophages» *Antibiotics* 11, no. 6: 734. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060734>

ВХ20. Использование метода гель-хроматографии для определения молекулярной массы нативных молекул изоформ γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы из проростков кукурузы (*Zea mays L.*)

Е.В. Плотникова (kate_plotnikova36@mail.ru)¹, Г.Б. Анохина¹, А.Т. Епринцев¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», Россия, Воронеж

Введение. γ -гидроксibuтиратдегидрогеназа (ГБДГ, 1.1.1.61) - фермент класса оксидоредуктаз, который участвует в процессе детоксикации янтарного полуальдегида, накопленного в клетке в результате воздействия абиотических стрессоров. Изучение ГБДГ представляет особый интерес, поскольку на данный момент еще не установлены основные физико-химические свойства данного энзима. В связи с этим целью данной работы является определение молекулярной массы нативных молекул изоформ ГБДГ методом гель-хроматографии, выделенных из проростков кукурузы (*Zea mays L.*).

Методы. В качестве объекта исследования использовали листья 7-ми дневных проростков кукурузы сорта Воронежская-76, выращенных гидропонно. Очистка ГБДГ состояла из нескольких этапов: гомогенизация в среде выделения (0,3 мМ ДДТ, 3 мМ ЭДТА, 0,1 мМ CaCl₂, 0,05% Tween-80, 0.1 М Tris-HCl буфер (pH 9.0)), фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрация через сефадекс G-25, ионообменная хроматография через ДЭАЭ-Sephacel. Молекулярную массу нативных белковых молекул изоформ ГБДГ определяли с помощью фильтрации через SephadexG-200.

Результаты. Получены гомогенные препараты двух изоформ ГБДГ из листьев проростком кукурузы. Для каждой изоформы определена молекулярная масса нативной молекулы с помощью гель-хроматографии с использованием SephadexG-200. Для первой изоформы (ГБДГ1) молекулярная масса нативной молекулы составила 31кДа, для второй изоформы (ГБДГ2) – 286кДа.

Выводы. Установлено, что проростки кукурузы содержат две изоформы γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы – ГБДГ1 и ГБДГ2. Определена молекулярная масса ГБДГ1 и ГБДГ2, а также выяснено, что молекулярная масса двух изоформ отлична друг от друга.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

БХ21. Влияние различных типов мембранотропных веществ для определения активности Na^+/K^+ -АТФазы в грубой микросомально-митохондриальной фракции коры больших полушарий головного мозга крыс

М.А. Тремясов (*tremyasov.miha@gmail.com*)¹, И.Р. Айтмухамбетова^{1,2}

¹Тюменский государственный медицинский университет, Россия, Тюмень

²Тюменский государственный университет, Россия, Тюмень

Введение. Na^+/K^+ -АТФаза является важнейшим белком, ответственным за работу Na^+/K^+ -насоса, участвует в регуляции гомеостаза, MAPK-пути, внутриклеточных ионов Ca^{2+} и активных форм кислорода. Na^+/K^+ -АТФаза является липидзависимым ферментом, располагающимся в бифосфолипидном слое. Для исследования активности данного фермента необходимо обеспечить диффузию экзогенного АТФ через липидный бислой к активному центру фермента с помощью детергентов. Детергенты нарушают укладку липидов, что приводит к меньшей стабильности конформационных состояний фермента во время каталитического цикла. Так, нам необходимо определить приемлемую концентрацию Tween-20 и Dox-Na, при которой будет достигнута оптимальная активность фермента.

Материалы и Методы. Для инкубирования использовали гомогенат коры больших полушарий головного мозга лабораторных крыс и концентрации соответствующих детергентов Dox-Na (0.25, 0.5, 0.75, 1.0 мг/мл) и Tween-20 (4, 5, 7, 8 мг/мл).

Результаты. В ходе работы мы выявили, что при использовании детергента Dox-Na активность всех исследованных изоформ Na^+/K^+ -АТФазы в смешанной мембранной фракции коры больших полушарий крыс, существенно изменялась, при этом максимальная активность фермента наблюдается при концентрации детергента 1,0 мг/мл. Нами были выявлены сходные величины латентной активности фермента при инкубации с Tween-20, однако максимальная активность обеих изоформ фермента наблюдается при большей концентрации детергента – 7 мг/мл. Оба использованных в работе детергента позволили выявить в смешанной мембранной фракции коры больших полушарий сходный уровень максимальной активности как общей Na^+/K^+ -АТФазы, так и ее отдельных изоформ.

Выводы. Активность Na^+/K^+ -АТФазы в грубой микросомально-митохондриальной фракции коры больших полушарий крыс может быть регулирована различными мембранотропными веществами, что открывает перспективы для дальнейших исследований, а также для разработки новых подходов к лечению заболеваний, связанных с дисфункцией фермента.

БХ22. In silico мутагенез терминальной дезоксинуклеотидилтрансфераз человека

Е.О. Укладов (e.ukladov@g.nsu.ru)^{1,2}, Т.Е. Тюгашев¹, Н.А. Кузнецов^{1,2}

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

²Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск

Введение. Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (TdT) относится к X семейству полимераз вместе с χ , β , γ , μ . Важнейшей особенностью TdT является способность к 5'-3'-безматричному синтезу ДНК за счёт особой структуры петли 1. В организме позвоночных TdT участвует в V(D)J-рекомбинации. TdT применяется в различных областях молекулярной и клеточной биологии, однако существенным недостатком является выраженная селективность к различным дНТФ. Поэтому актуально моделирование аминокислотных замен, позволяющих охарактеризовать роль остатков в активном центре (АЦ), петле 1 и потенциально изменяющих селективность фермента.

Методы. Структура белка получена с помощью Modeller, использовалась dummy model ионов Mg^{2+} , для параметризации дНТФ использовался сервер RED. Молекулярная динамика проводилась в ПО GROMACS с силовыми полями 14SB для белка и OL15 для ДНК с моделью воды TIP3P. Анализ результатов производился с помощью языка Python 3.10 пакетами pandas, matplotlib.pyplot, seaborn и scipy.stats.

Результаты. Для проведения функционального анализа отобраны остатки D345, D395, L397, F400, E456, D472 входящие в состав АЦ или петли 1. Для фермента дикого фермента и мутантных форм были получены модельные структуры двойных белок-ДНК и тройных белок-ДНК-дНТФ комплексов. Обнаружено изменение геометрии АЦ для формы D345E, дестабилизация петли 1 при заменах L397A, F400A, D472A, а также стабилизации петли 1 при двойной замене D395K+E456Q. На основании анализа модельных структур предложены замены D395E, D395N, D395Q, E456N, E456Q, D395N+E456N, D395Q+E456Q, D395Q+E456N, потенциально изменяющие субстратную селективность фермента. Из них наибольшую стабилизацию положения азотистого основания дНТФ за счёт образования водородных связей показали D395N и D395N+E456N.

Выводы. Была выяснена роль аминокислотных остатков D345, L397, F400, D472, D395 и E456 в связывании дНТФ. Предложены мутантные формы с потенциально выровненной селективностью к дНТФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-64-00017

БХ23. Влияние цинка на структуру фактора пигментного эпителия сетчатки

М.Л. Шишкин (*zevota798@gmail.com*)¹, С.С. Тулуш¹, Т.К. Булгаков², В.Е. Бакшеева^{3,4}, Е.Ю. Зерный⁴

¹Институт цифрового биодизайна и моделирования живых систем ПМГМУ им. Сеченова, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³Институт нейрофизиопатологии, Университет Экс-Марсель, Франция, Марсель

⁴НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Россия, Москва

Введение. Глаукома – нейродегенеративное заболевание, связанное с гибелью ганглиозных клеток сетчатки. Нейротоксический эффект при глаукоме может быть опосредован ионами мобильного цинка и снижением активности нейротропных факторов, которые при взаимодействии с ионами этого металла могут изменять свою функциональную активность. Настоящая работа посвящена идентификации таких белков и исследованию влияния цинка на их структурные свойства.

Методы. Цинксвязывающие сайты в секретируемых белках сетчатки предсказывали в структурах PDB *in silico* с помощью нейросетевых классификаторов ZincBind. Генетическую конструкцию для экспрессии фактора пигментного эпителия сетчатки PEDF в бактериальной системе получали методами молекулярного клонирования на основе тотальной мРНК клеток ретинобластомы человека линии Y79. Препарат PEDF выделяли из бактериальных лизатов с помощью ионообменной и аффинной хроматографии. Взаимодействие PEDF с цинком изучали методами дифференциальной сканирующей флуориметрии, спектрофлуориметрического титрования в присутствии флуоресцентного зонда bis-ANS, а также с помощью исследования динамического рассеяния света и спектроскопии кругового дихроизма.

Результаты. С применением структурно-биоинформатического анализа выявлено, что в молекуле PEDF присутствуют три потенциальных Zn²⁺-связывающих сайта. С помощью экспрессии в бактериях и хроматографического выделения получен гомогенный препарат рекомбинантного PEDF с чистотой более 95%. Методом исследования спектроскопии кругового дихроизма выявлено, что Zn²⁺ не влияет на вторичную структуру PEDF. При этом с использованием флуоресцентного зонда bis-ANS установлено, что связывание Zn²⁺ индуцирует конформационные изменения, ассоциированные с экспонированием гидрофобных остатков белка. По данным дифференциальной сканирующей флуориметрии и динамического светорассеяния, в присутствии низких концентраций цинка происходит умеренная дестабилизация структуры PEDF, в то время как при его высоких концентрациях - образование функционального олигомера белка.

Выводы. PEDF впервые идентифицирован как Zn²⁺-сенсорный белок, который в зависимости от концентрации внеклеточного цинка может претерпевать конформационные перестройки или обратимую олигомеризацию. Подобные структурные изменения могут снижать нейротропную активность PEDF и опосредовать гибель нейронов сетчатки при глаукоме.

БХ24. Химическая модификация жасминовой кислоты по С4 в реакции альдольной конденсации инактивирует гормон

Д.А. Янковский (davidyankovskiu@gmail.com)¹, Т.Н. Бибикова¹, Д.В. Кочкин¹

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Жасминовая кислота - это растительный гормон, обуславливающий ответы на такие стрессовые факторы как механическое повреждение, атака растения патогенами и др. Единственной активной формой гормона *in vivo* является конъюгат с изолейцином. К настоящему моменту отсутствуют данные о механизме связывания этого гормона с рецептором, а, следовательно, остаётся неясной роль структурных частей молекулы в её рецепции. Целью данной работы являлось изучение влияния химической модификации жасмоната по С4 в результате реакции альдольной конденсации на активность гормона.

Методы. Жасминовую кислоту получали из метилжасмоната реакцией щелочного гидролиза. В качестве карбонильной компоненты в реакции альдольной конденсации использовали формальдегид. Реакция проходила по механизму щелочного катализа при температуре 35 °С. Продукты реакции удаляли из реакционной смеси экстракцией органическими растворителями, которые затем собирали и упаривали на роторном испарителе. Разделение продуктов реакции осуществляли методом колоночной хроматографии. На каждой из стадий, описанных выше, осуществляли контроль образующихся продуктов методами тонкослойной хроматографии на силикагеле и ВЭЖХ-МС. В качестве модельного объекта использовали *Arabidopsis thaliana*, чьи семена высаживали стерильно на фитогель, содержащий 1/2 MS-среду и 1% сахарозу, в трёх вариантах. В первом, в среде присутствовало 30 мкМ жасминовой кислоты, во втором 30 мкМ полученной 4-гидроксиметилжасминовой кислоты. Третий вариант являлся контрольным. После высаживания семена стратифицировали в течение недели. Активность гормона оценивали по скорости роста корней; измерения проводили на протяжении 7 дней с интервалом в сутки.

Результаты. Растения, подвергавшиеся действию жасминовой кислоты, характеризовались замедленным прорастанием и замедленной скоростью роста главного корня, в то время как 4-гидроксиметилжасмонат не проявлял подобной активности. Активной формой данного гормона является конъюгат жасминовой кислоты с изолейцином, поэтому полученный результат может быть объяснён как невозможностью связывания образующегося в клетке изолейцинового конъюгата 4-гидроксиметилжасмоната с рецептором, так и невозможностью клеточного фермента образовывать необходимый конъюгат. Таким образом, в дальнейшем исследовании следует провести аналогичную реакцию с изолейциновым конъюгатом жасмоната и проверить активность полученного соединения.

Выводы. В ходе работы был получен и очищен 4-гидроксиметилжасмонат. Опыт на *Arabidopsis thaliana* показал, что модификация жасминовой кислоты по С4-положению привела к потере физиологической активности молекулы, что может свидетельствовать о важной роли С4-атома циклопентанового кольца жасмоната в рецепции молекулы.

Секция «Молекулярная и клеточная биология»

МБ1. Роль p53-зависимого сигналинга в устойчивости клеточной линии A549 к митотическим ингибиторам

Я.Е. Абраменко (yaroslav.abramenko.01@gmail.com)^{1,2}, А.И. Хамидуллина¹, В.В. Татарский¹

¹Институт биологии гена РАН, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Транскрипционный фактор p53 является ключевым опухолевым супрессором, регулирующим процессы, которые предотвращают злокачественную трансформацию, включая ответ на ДНК-повреждение, контроль клеточного цикла и программированную клеточную гибель. Известно, что более 50% опухолей содержат инактивирующие мутации в гене TP53, что говорит об исключительной важности белка p53 в онкогенезе и терапии рака. Митотические ингибиторы, такие как таксаны и винка-алкалоиды являются одними из используемых в настоящее время препаратов химиотерапии. На данный момент разрабатываются новые таргетные антимиотические препараты, такие как ингибиторы кинезина веретена деления Eg5. Показано, что применяемые в терапии митотические ингибиторы часто менее эффективны при мутациях гена TP53. Данная работа посвящена изучению роли p53 в устойчивости линии немелкоклеточного рака легкого A549 к терапевтическим антимиотическим препаратам и перспективному ингибитору кинезина Eg5 - SB743921.

Методы. SRB-тест, проточная цитометрия, вестерн-блот, конфокальная микроскопия.

Результаты. Анализ цитотоксичности с использованием сульфородамина В (SRB), а также исследование клеточного цикла с помощью проточной цитометрии показали, что SB743921 вызывает необратимое ингибирование роста клеток A549 в наномолярных концентрациях, в то время как при действии классических ингибиторов образовывались устойчивые колонии с пролиферирующими клетками. При этом изогенная линия с нокаутом TP53 была более чувствительна к SB743921. При помощи конфокальной микроскопии было показано отсутствие репликации (включения EdU) при действии SB743921, но не других митотических ингибиторов при продолжительном культивировании клеток после удаления препарата из культуральной среды. Анализ изменения ряда белков, ответственных за ответ на ДНК-повреждение и/или остановку клеточного цикла, был проведен при помощи вестерн-блота.

Выводы. Таким образом, ингибиторы кинезина Eg5 могут рассматриваться как перспективные препараты для терапевтического применения при наличии мутаций в гене TP53 и при возникновении устойчивости к таксанам и винкаалкалоидам.

МБ2. Додецил-содержащие производные олигонуклеотидов: особенности самосборки и нековалентных взаимодействий с сывороточным альбумином человека

И.А. Бауэр (i.bauer@g.nsu.ru)^{1,2}, Т.Д. Жарков¹, Е.В. Дмитриенко^{1,2}

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

²Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск

Введение. Последние достижения в области генетики и химии нуклеиновых кислот позволили создать принципиально новые терапевтические препараты, избирательно воздействующие на причину заболевания. Однако, несмотря на достигнутые успехи, остаются нерешенными проблемы улучшения фармакокинетических свойств терапевтических олигонуклеотидов при сохранении их биологической активности. Одним из перспективных подходов является синтез олигонуклеотидов, содержащих гидрофобные остатки для повышения эффективности проникновения таких производных в клетки и улучшения их фармакокинетических свойств. Понимание механизмов взаимодействия с сывороточным альбумином человека (HSA), самым распространенным белком плазмы крови, может обеспечить новые возможности и свойства для терапевтических олигонуклеотидов амфифильной природы, такие как повышенная стабильность, снижение иммунного ответа и контролируемое биораспределение.

Материалы и Методы. В ходе работы изучены особенности самосборки новых олигонуклеотидных производных, содержащих на 3'-конце триазиниламидофосфатную модификацию с двумя додецильными остатками, методами динамического светорассеяния и флуоресцентной спектроскопии в зависимости от длины последовательности и её нуклеотидного состава. Их ассоциаты с HSA были изучены методом задержки в геле. С помощью проточной цитофлуориметрии показана эффективность накопления дуплексных структур, одна из цепей которых содержит замещенный додецильными группами триазиниламидофосфат, на линиях эукариотических клеток HEK293 и T98G.

Результаты. Установлено, что Введение триазиниламидофосфатной модификации, содержащей две додецильные группы, на 3'-конце олигонуклеотидной последовательности, незначительно влияет на ее сродство к комплементарной последовательности. Исследуемые амфифильные олигонуклеотиды способны самособираться в мицеллоподобные ассоциаты размером 8-15 нм. Олигонуклеотиды с додецильными группами образуют устойчивые комплексы с HSA с константой диссоциации порядка 10^{-6} М. При этом мицеллоподобные структуры олигонуклеотидов разрушаются при связывании с белком. Исследуемые олигонуклеотидные производные, как по отдельности, так и в комплексах с HSA, способны эффективно проникать в клетки HEK293 и T98G.

Выводы. Подводя итог, в настоящей работе представлено изучение особенностей самосборки, формирования нековалентных ассоциатов с сывороточным альбумином человека, а также проникновения в клетки новых амфифильных производных олигонуклеотидов. Полученные данные, а также уже известные факты, что они обладают повышенной устойчивостью к клеточным нуклеазам и не проявляют значительной цитотоксичности, делают их очень привлекательными кандидатами для биомедицинских разработок.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания ИХБФМ СО РАН №121031300042-1

МБЗ. Мезильная модификация увеличивает стабильность малых интерферирующих РНК без потери их биологической активности

И.К. Бачкова (i.bachkova@g.nsu.ru)^{1,2}, С.А. Жуков¹, Е.Л. Черноловская¹, И.В. Черников¹

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

²*Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск*

Введение. Терапевтические препараты на основе малых интерферирующих РНК (siРНК) подавляют экспрессию генов по механизму РНК-интерференции (RNAi). Для защиты от расщепления нуклеазами организма в состав siРНК включают химические модификации. Мезильная модификация (μ) является перспективным аналогом широко используемой в составе siРНК фосфотиоатной модификации (PS), поскольку она обеспечивает большую нуклеазоустойчивость и не проявляет токсичности.

Методы. Для оценки нуклеазоустойчивости siРНК инкубировали в гомогенате печени мыши при 37 °С в течение 7 дней и анализировали с помощью нативного ПААГ-электрофореза. Для определения IC_{50} клетки KB-3-1-MDR1-GFP трансфицировали различными концентрациями анти-MDR1 siРНК, экспрессию химерного белка MDR1-GFP определяли методом проточной цитофлуориметрии. Относительную активность siРНК ($Отн_A$) рассчитывали как отношение IC_{50} контрольной siРНК к IC_{50} siРНК с модификациями фосфатной группы.

Результаты. Показано, что единичная μ модификация в 27 из 28 исследованных положениях дуплекса практически не снижает биологическую активность siРНК ($Отн_A = 0.66-2.5$). Исключение составляла siРНК, содержащая μ в 1 положении антисмысловой цепи, активность которой снижалась на порядок ($Отн_A = 0.12$). Чувствительность этого положения к более объемной модификации может быть связана с ее препятствованием фосфорилированию 5'-конца антисмысловой цепи. На основании этих данных создан паттерн модификаций, содержащий μ в 25 из 42 возможных положений, сохраняющий интерферирующую активность siРНК ($Отн_A = 0.95$). После 7 дней инкубации в гомогенате печени мыши ~70% siРНК с концевыми PS подверглись расщеплению, при этом, siРНК с концевыми μ оставалась интактной.

Выводы. Впервые показано, что μ повышают стабильность siРНК в биологических средах и могут быть использованы в составе «тяжелых» паттернов модификации siРНК без потери её биологической активности.

Исследование было поддержано грантами РФФИ 19-14-00251 и 24-14-00110.

МБ4. Рецептор эстрогенов α – потенциальная мишень новых изокриптолепинов

Ф.Б. Бозданов (*f.bogdanov.f@yandex.ru*)^{1,2}, Р.Ю. Балахонов³, О.Е. Андреева², В.З. Ширинян³, А.М. Щербаков²

¹Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Отдел экспериментальной биологии опухолей НИИ Канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Россия, Москва

³Лаборатория гетероциклических соединений им. академика А.Е. Чичибабина ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского» РАН, Россия, Москва

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным типом злокачественных новообразований среди женского населения по всему миру. Уровень заболеваемости РМЖ по-прежнему остается высоким: в 2023 году было выявлено 77 тысяч новых случаев заболевания в России, что делает его важной проблемой современного здравоохранения. Изокриптолепины являются перспективным классом природных алкалоидов, обладающих противоопухолевым действием, что делает разработку новых химиотерапевтических средств на их основе актуальной задачей практической онкологии.

Цель исследования – оценка антипролиферативной активности новой серии производных изокриптолепина на клеточных линиях рака молочной железы с определением молекулярных мишеней для лидерного соединения.

Методы. Новая серия производных изокриптолепина была получена по реакции Фишера с использованием 2-арилиндролов в качестве исходных соединений. Оценка антипролиферативной активности синтезированных соединений выполнена методом МТТ на клетках рака молочной железы MCF7, T47D (гормонозависимые), MDA-MB-231 (трижды негативные) и HCC1954 (HER2-положительные) (ATCC). Антиэстрогенный потенциал лидерного соединения оценивался с использованием репортерной системы MCF7/ERE-LUC.

Результаты. Полученные изокриптолепины показали (суб)микромольную ингибирующую активность в отношении выбранных клеточных линий РМЖ. Значения IC50 лидерного соединения Ig-239base составили 0,3 μM и 0,12 μM для гормонозависимых типов РМЖ (MCF7 и T47D, соответственно), 3,36 μM и 3,86 μM для клеточных линий, не экспрессирующих на своей поверхности рецепторы эстрогенов ($\text{ER}\alpha$) - MDA-MB-231 и HCC1954 соответственно. Для оценки антиэстрогенного потенциала Ig-239base клетки MCF7 трансфицировали плазмидой, содержащей репортерную конструкцию с геном люциферазы под контролем эстроген-чувствительного промотора (ERE). Экспрессию и активность люциферазы в полученных клетках MCF7/ERE-LUC индуцировали физиологическим лигандом рецептора эстрогенов α - 17 β -эстрадиолом (10 нМ E2). Изокриптолепин Ig-239base вызывал 50% ингибирование активности люциферазы в концентрации 0,12 μM , что говорит о его высокой ингибирующей способности в отношении $\text{ER}\alpha$.

Выводы. Обнаружена значительная избирательность изокриптолепина Ig-239base в отношении гормонозависимого рака молочной железы человека. Рецептор эстрогенов α , ключевой драйвер роста этой группы опухолей, рассматривается в качестве молекулярной мишени лидерного изокриптолепина.

МБ5. Изучение редокс статуса и активности антиоксидантных систем стволовых клеток глиобластом с различной чувствительностью к химиотерапии

Т.К. Булгаков (*locusts2001@gmail.com*)¹, В.И. Меццержакова², Т.О. Абакумова³, М.Ю. Кордюкова², В.В. Белоусов^{2,3}

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА РФ, Россия, Москва

³Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет имени Н.И. Пирогова, Россия, Москва

Введение. Глиобластома (ГБМ) — агрессивная опухоль головного мозга, склонная к выработке устойчивости к терапии и развитию рецидивов. Резистентность во многом обеспечивается стволовыми клетками глиобластомы (СКГ), дающими начало новым клеткам опухоли при рецидиве. СКГ можно классифицировать на два транскриптомных подтипа: мезенхимальный и проневральный. Первый тип клеток более устойчив к действию терапии, в то время как проневральные клетки менее агрессивны. Показано, что резистентность ГБМ к химиотерапии ассоциирована с повышенной устойчивостью клеток опухоли к окислительному стрессу, поэтому цель настоящей работы — определение активности антиоксидантных систем (АОС) СКГ и изучение ее взаимосвязи с характеристиками клеток.

Методы. Для анализа использовали первичные культуры СКГ, полученные в нашей лаборатории из послеоперационного материала пациентов. Чувствительность СКГ к окислительному стрессу определяли по образованию внутриклеточного H₂O₂ с помощью генетически кодируемого флуоресцентного редокссенсора НuPer7 при действии ингибиторов АОС: ауранофина, ингибитора тиоредоксинредуктазы, и бутионинсульфоксимиона (BSO), ингибитора γ -глутамилсинтетазы. АОС СКГ характеризовали по содержанию глутатиона и активности тиоредоксинредуктазы в клеточных экстрактах. Подтип СКГ выявляли с помощью ПЦР в реальном времени.

Результаты. Часть первичных культур СКГ были более чувствительны к ауранофину, чем остальные, в то время как все исследованные культуры были устойчивы к действию BSO. Клетки, устойчивые к ауранофину, содержали больше глутатиона, а часть из них обладала также повышенной тиоредоксинредуктазной активностью. При этом линии с устойчивостью к ауранофину, высоким содержанием глутатиона и активностью тиоредоксинредуктазы обнаруживали экспрессию генов, характерных для клеток мезенхимального подтипа, в то время как профиль экспрессии у культур, более чувствительных к ауранофину и содержащих меньше глутатиона, соответствовал проневральному подтипу.

Выводы. СКГ, чувствительные к ауранофину, демонстрируют низкую активность АОС и могут быть отнесены к проневральному подтипу, а СКГ, устойчивые к ауранофину, обладают повышенной активностью АОС и относятся к мезенхимальному подтипу. Полученные данные в дальнейшем позволят разрабатывать более эффективные подходы к персонализированной терапии глиобластом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 22-75-10151.

МБ7. Исследование свойств химерных белков, состоящих из тропонина С и сердечной изоформы тропонина I или ее фрагмента

А. Д. Голубева (*nasty_a_golubeva_02@inbox.ru*)¹, Д. А. Кузнецова¹

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Сердечная изоформа тропонина I (сTnI) играет важную роль в диагностике сердечных заболеваний. При инфаркте миокарда сTnI или его фрагменты присутствуют в крови в виде тройного комплекса с тропонином С (TnС) и тропонином Т (TnТ) или двойного комплекса с TnС. Для иммунохимической детекции сTnI в клинических образцах необходим белок-стандарт с известной концентрацией. В качестве такого стандарта может выступать рекомбинантный химерный белок, состоящий из сTnI или его фрагмента, связанный линкером с TnС. Длина линкера может оказывать влияние на иммунохимические свойства химерного белка и его способность образовывать комплекс с TnТ. В данной работе изучали свойства следующих химерных белков с подвижными линкерами 4GS: TnI-4GSx3-TnС, TnI(20-190)-4GSx4-TnС и TnI-4GSx5-TnС.

Методы. Для увеличения уровня экспрессии TnI-4GSx3-TnС методом ПЦР-мутагенеза в 5'-конец гена были введены синонимичные точечные мутации, снижающие вероятность образования вторичных структур мРНК. Полученную конструкцию клонировали в вектор pET22b(+) и амплифицировали в штамме JM109. Конструкции трёх химерных белков трансформировали в экспрессионный штамм E.coli Rosetta.

Рекомбинантные белки очищали методом иммуноаффинной хроматографии на носителе с антителами специфичными к различным участкам TnI (16A11, 8E10, 19C7 и 560). Концентрацию белка в полученных препаратах определяли спектрофотометрически, методом сэндвич-ИФА и вестерн-блоттинга. Способность к образованию комплексов оценивали методом сэндвич-ИФА после инкубации химерных белков с TnТ в буфере, содержащем 5 мМ СаСl₂.

Результаты. Путем оптимизации 5'-конца гена удалось увеличить уровень экспрессии TnI-4GSx3-TnС приблизительно в 10 раз. Методами аффинной хроматографии были получены очищенные препараты трех химерных белков с концентрацией 0.13 - 0.27 мг/мл. Исследуемые химерные белки не образуют комплексы с TnТ, что, вероятно, связано с изменением конформации тропонинов, вызванным наличием линкера.

Выводы. Был повышен уровень экспрессии химерного белка TnI-4GSx3-TnС и получены очищенные препараты трех химерных белков с известной концентрацией, которые не взаимодействуют с TnТ.

МБ8. Фотопереключаемое расщепление ДНК нуклеазой Cas9 с использованием азобензол-модифицированных аналогов направляющих РНК

Е.С. Горленко (e.gorlenko@g.nsu.ru)^{1,2}, Д.С. Новопашина^{1,2}

¹*Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск*

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

Введение. Введение фоточувствительных компонентов в состав нуклеотидных конструкций позволяет создавать молекулярно-биологические системы с эффективной пространственно-временной регуляцией за счет облучения светом. В качестве таких фотолинкеров могут выступать производные азобензола, изменяющие конформацию и, как следствие, пространственную структуру олигонуклеотидов при облучении светом различных длин волн. Целью работы является разработка подхода к обратимому фоторегулируемому направленному расщеплению ДНК нуклеазой Cas9 с использованием фотомодифицированных sgРНК.

Методы. Фотомодифицированные направляющие РНК с двумя типами фотолинкеров на основе азобензола получали твердофазным фосфитамидным методом. Изменение конформации фотолинкеров осуществляли путем облучения видимым светом с длиной волны 505 нм (транс-изомер) или УФ-светом с длиной волны 380 нм (цис-изомер). Для проверки эффективности действия в качестве модельного субстрата использовали плазмиду, содержащую участок узнавания системой CRISPR/Cas9 и мотив PAM.

Результаты. Созданы фотомодифицированные sgРНК двух типов. Первые содержат ненуклеотидную вставку с остатком азобензола, направленным в сторону большой бороздки, а вторые содержат азобензол в составе рибозофосфатного остова. При использовании одного фотолинкера независимо от его типа, как и ожидалось, при УФ-облучении происходит снижение эффективности расщепления плазмиды из-за перехода азобензольного фрагмента из плоского трансизомера в цис-изомер, что нарушает стабильность комплекса sgРНК/ДНК-мишень. При введении двух фотолинкеров первого типа в РНК после УФ-облучения наблюдали менее заметное уменьшение эффективности расщепления плазмиды. При использовании двух фотолинкеров второго типа в составе sgРНК при УФ-облучении регистрировали увеличение эффективности расщепления плазмиды по сравнению с облучением видимым светом.

Выводы. Полученные результаты подтверждают перспективность предложенного подхода к использованию азобензол-модифицированных аналогов направляющих РНК в составе регулируемой системы редактирования генома CRISPR/Cas9.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-14-00294.

МБ9. Исследование группы транскрипционных факторов в процессах дифференциации тканей кишечника на свободноживущем плоском черве *Macrostomum lignano*

А.М. Дмитриева (a.dmitrieva1@g.nsu.ru)^{1,2}, Е.К. Сильванович², Г.Ю. Чепурнов², М.Ю. Бирюков^{1,2}

¹Факультет естественных наук НГУ, Россия, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Большая часть функциональных свойств клетки закладывается на этапе транскрипции. Считается, что транскрипционные факторы играют одну из ключевых ролей в процессах дифференцировки различных типов клеток и формирования из них более крупных структур (органов и тканей). По этой причине, комплексное и детальное понимание механизмов действия факторов транскрипции является приоритетной научной задачей. *Macrostomum lignano* свободноживущий плоский червь, является перспективным модельным объектом для изучения транскрипционных факторов. Сочетание уникальных свойств позволяет проводить на *M. lignano* исследования различных процессов развития и дифференцировки клеток, регенерации органов и тканей, изучать механизмы старения. Наличие трансенных линий, экспрессирующих тканеспецифичные репортеры, позволяет облегчить процесс визуализации, а также способствовало разработке протоколов РНК-интерференции.

Методы. На основе данных RNA-seq были выбраны гены-кандидаты в транскрипционные факторы в развитии и функционировании тканей кишечника. В эксперименте участвовала группа из 8 генов. Для исследуемых генов была разработана дцРНК в клетках *E. coli* HT115.

Эксперименты проводились на трансгенной линии KIS*АРОВ со встройкой зеленого флуоресцентного белка GFP под промотором тканеспецифичного для кишечника транскрипционного фактора АРОВ (АРОВ:omGFP). Методом РНК интерференции черви обрабатывались раствором дцРНК целевых генов с дозировкой 10 нг/мкл в течение 2-3 недель. Изменения в уровне флуоресценции белка АРОВ:omGFP оценивались при помощи флуоресцентной микроскопии.

Результаты. В результате сравнительного анализа опытной группы с червями из группы контроля были обнаружены отличия на четырех генах-кандидатах: NPDC1, KRI1, Mlig455_053566, Mlig455_069319. Наблюдалось снижение вплоть до полной утраты на отдельных червях флуоресценции белка GFP. В конструкции используемой трансгенной линии, данный белок регулируется консервативным тканеспецифичным транскрипционным фактором, экспрессирующим в клетках кишечника (АРОВ). Утрата флуоресценции, как фенотип, сопоставима с паттерном экспрессии червей, находящихся в голодном состоянии. Также были отмечены негативные изменения в пищевом поведении и фертильности червей, что привело к резкому снижению их плодовитости.

Выводы. В ходе работы показано, что нокаунд выбранных генов-кандидатов приводит к неопределённым изменениям в структурах кишечника и пищевом поведении *Macrostomum lignano*, что в свою очередь влияет на жизненно-важные процессы организма. Снижение флуоресценции указывает на вероятные нарушения экспрессии фактора транскрипции АРОВ, происходящие в клетках кишечника. Эти изменения представляют интерес для дальнейшего исследования.

МБ10. Активность 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз *Escherichia coli* и человека на коротких петлях ДНК

Д.А. Ерошенко (*daraero19@gmail.com*)¹, Е.А. Дятлова², Д.О. Жарков^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

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

Введение. Сохранение целостности генома — необходимое условие выживания для всех организмов. В результате окислительного стресса в клеточной ДНК возникает предмутагенное повреждение 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин (8-охоG), которое исправляется системой эксцизионной репарации оснований (ЭРО). В бактериальных клетках 8-охоG узнаёт и удаляет формамидопиримидин-ДНК-N-гликозилаза (Fpg), а в эукариотических — 8-оксогуанин-ДНКгликозилаза OGG1. Ошибки ДНК-полимераз во время репликации могут приводить к образованию коротких выпетливаний длиной 1–2 нуклеотида в матричной или дочерней цепи ДНК. Такие структуры также могут подвергаться окислению и вносить вклад в общую геномную нестабильность.

Методы. В работе была исследована ферментативная активность Fpg *E. coli* в одно- и двухнуклеотидных петлях ДНК в условиях стационарной кинетики, OGG1 человека в условиях кинетики одного оборота и кинетики фазы всплеска. Для прояснения природы различий в эффективности репарации 8-охоG были получены значения K_d для изученных субстратов методами задержки в нативном геле и микромасштабного термофореза.

Результаты. Fpg удалял 8-охоG в однонуклеотидном выпетливании с такой же эффективностью, как и 8-охоG из состава пары 8-охоG:C. Кинетическая эффективность Fpg (k_{cat}/K_M) по отношению к субстратам, содержащим 8-охоG в двухнуклеотидном выпетливании, примерно в 20 раз ниже, чем к 8-охоG в составе канонической ДНК. OGG1 человека значительно хуже, чем Fpg, выщеплял 8-охоG из субстратов с короткими выпетливаниями. Константы скорости каталитической стадии для них были на 2 порядка ниже, чем для канонического субстрата 8-охоG:C, при этом эффективнее всего реакция проходила для субстрата с однонуклеотидным выпетливанием.

Наличие выпетливаний незначительно влияло на сродство обоих ферментов к ДНК: наибольшие значения K_d наблюдались для субстрата с двухнуклеотидным выпетливанием в первом положении.

Выводы. Полученные кинетические параметры, а также эксперименты по реконституции цикла ЭРО, показывают, что репарация 8-охоG в составе коротких петель может происходить в клетках *E. coli* и, вероятно, других бактерий. Однако система ЭРО человека неэффективно узнает и процессирует подобные субстраты, и в клетках человека такой механизм маловероятен.

МБ11. Исследование роста нейроподобных клеток на скаффолдах из поли-3-оксибутирата с магнитоактивными наноматериалами

А.И. Зельцер (angelinazeltser.y@student.msu.ru)¹, А.П. Бонарцев¹, И.И. Жаркова¹

¹*Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Культура клеток нейробластомы человека SH-SY5Y считается эффективной клеточной моделью болезни Паркинсона. Они способны к терминальной дофаминергической дифференцировке при воздействии транс-ретиноевой кислоты (РК). Биополимер поли-3-оксибутират (ПОБ) обладает пьезоэлектрическими свойствами и, соответственно, потенциалом нейрозащитного агента в сфере регенерации нервной ткани. Мы исследовали способность электроспиннинговых скаффолдов на основе ПОБ с добавлением магнитных наночастиц (ПОБ/МНЧ) и магнитных наночастиц с оксидом графена (ПОБ/МНЧ/ГО) поддерживать рост дифференцированных клеток SH-SY5Y.

Методы. Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y культивировали в ростовой среде DMEM/F12 (1:1), 15% инактивированной телячьей сыворотки (инТС), 1% антибиотика при 37°C и 5% CO₂. Среду меняли каждые два дня до достижения 80% конфлюэнтности. Нейрональную дифференцировку проводили путем последовательного снижения концентрации сыворотки в среде с воздействием 10 мкМ РК в течение 12 суток. Экспрессию нейронспецифической енолазы (НСЕ) исследовали с помощью набора ИФА (ХЕМА, Россия), оптическую плотность измеряли 450 нм на микропланшетном ридере Hidex Plate Chameleon. Дифференцированные клетки визуализировали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000 с окрашиванием Hoechst 33342 и PhalloidiniFluor 594. Длину нейритов и проекционную площадь дифференцированных клеток определяли с помощью плагина NeuronJ программы ImageJ. Клетки засеивали на скаффолды ПОБ, ПОБ/МНЧ и ПОБ/МНЧ/ГО, рост клеток оценивали на 2, 5, 8 и 12 сутки дифференцировки с помощью AlamarBlue. Статистический анализ проводили в GraphPad Prism 9 с использованием ANOVA и t-критерия Стьюдента. Результаты выражаются в виде среднего значения ± SEM.

Результаты. Было обнаружено, что использованная методика дифференцировки привела к повышению концентрации НСЕ в дифференцированных клетках ($p=0,001$). Длина нейритов SH-SY5Y увеличилась, а площадь клеток уменьшилась ($p < 0,001$ и $p=0,01$ соответственно). Отмечено снижение роста дифференцированных клеток SH-SY5Y на скаффолдах ПОБ и ПОБ/МНЧ к 5 суткам культивирования ($p < 0,001$), но не на скаффолдах ПОБ/МНЧ/ГО.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что скаффолды ПОБ/МНЧ/ГО поддерживают направленный рост и нейрональную дифференцировку клеток SH-SY5Y, что подчеркивает перспективность исследования композитных скаффолдов на основе ПОБ в области регенерации нервной ткани.

МБ12. Оценка скорости рецептор-опосредованного эндоцитоза аптамеров к egfr с использованием метода xcelligence

Б. М. Иванов (ivanovb661@yandex.ru)¹, О. М. Антипова¹, Ф. М. Дзариева², Г. В. Павлова^{2,3}, А. М. Копылов^{1,3}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Россия, Москва

³Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко, Россия, Москва

Введение. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) – значимый молекулярный маркер глиобластомы (ГБ), злокачественной опухоли головного мозга. EGFR может быть использован в качестве мишени для направленной доставки токсического агента к клеткам ГБ. В настоящей работе в качестве адресного агента использовали анти-EGFR ДНК-аптамер GR20.

Методы. Кинетику проникновения аптамера в клетки MCF7 с низкой экспрессией EGFR, A431 с высокой представленностью EGFR и клетки перевиваемой культуры глиобластомы пациента Sus с низким уровнем EGFR, определяли при помощи клеточного анализатора xCelligence, который позволяет в режиме реального времени отслеживать жизнеспособность адгезионных клеток. В качестве индикатора проникновения аптамера в клетку использовали доксорубин (ДОКС), цитотоксический противоопухолевый препарат, способный интеркалировать двойную спираль ДНК. Аптамер содержал дополнительный участок, с которым был гибридизован 18-ти звенный олигонуклеотид (GR20hh) для эффективной интеркаляции ДОКСом.

Результаты. Анализ кривых выживаемости показал, что клетки с различной скоростью интернализуют ДОКС. Однако, для EGFR- клеток MCF7 при воздействии ДОКСа самого по себе или в составе комплекса с аптамером GR20hh+ДОКС скорости гибели клеток практически совпадали. Для EGFR+ клеток A431 скорость гибели при воздействии комплекса аптамера GR20hh+ДОКС была значительно выше, чем для самого по себе ДОКСа, что говорит о более высокой скорости проникновения аптамерного комплекса GR20hh+ДОКС в клетку по сравнению со свободной диффузией ДОКСа, по-видимому, вследствие рецептор-опосредованного эндоцитоза. В случае клеток Sus скорость гибели при воздействии комплекса GR20hh+ДОКС была значительно ниже как по сравнению с ДОКСом, так и по сравнению с EGFR- клетками MCF7.

Выводы. Такое необычное поведение может говорить о том, что клетки Sus используют EGFR-независимый путь интернализации аптамерной конструкции GR20hh+ДОКС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по соглашению №075-15-2020-809 (вн. номер 13.1902.21.0030).

МБ13. Влияние клеточных шаперонов на процесс амилоидного и прионного превращения белка Sup35 в составе биомолекулярных конденсатов в клетках дрожжей

Л.В. Иванова (iwanolaluda54@gmail.com)¹, А.А. Дергалева²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Россия, Москва

Введение. Образование обособленной жидкой фазы (конденсатов) в водных растворах – широко распространенный в природе вид обратимой агрегации белков и нуклеиновых кислот, который используется клетками для безмембранной компарментализации определенных клеточных процессов. Недавно было показано, что обособленную жидкую фазу способны образовывать многие амилоидогенные белки, такие как PrP, синуклеин и тау-белок. Хотя такая агрегация может быть необходима этим белкам для выполнения их физиологических функций, однако, в некоторых случаях она облегчает переход этих белков в состояние амилоида - и, тем самым, может участвовать в патогенезе некоторых заболеваний. В нашей недавней работе мы продемонстрировали, что прионный белок дрожжей Sup35 может образовывать амилоидные полимеры и переключаться в прионное состояние посредством возникновения и постепенного затвердевания обособленных жидких конденсатов *in vivo*.

В данном исследовании нашей целью было изучить клеточные факторы, влияющие на амилоидную агрегацию и прионный переход белка Sup35NM-GFP в составе биомолекулярных конденсатов, возникающих при его сильной сверхпродукции в дрожжах. В частности, мы определяли, какое влияние на эти процессы может оказать сверхпродукция ряда клеточных шаперонов, в норме вовлеченных в поддержание прионной формы Sup35.

Методы. Дрожжевая трансформация, флуоресцентная микроскопия, детекция амилоидных полимеров методом SDD-AGE, определение частоты возникновения приона [PSI+].

Результаты. Мы установили, что сверхпродукция шаперонов Ssa1 и Ydj1 существенно ускоряет процесс амилоидизации белка Sup35NM-GFP в составе конденсатов, тогда как сверхпродукция шаперона Hsp104 не оказывает заметного влияния на этот процесс. В отличие от сверхпродукции шаперона Ydj1, избыток Ssa1 приводит к массивному образованию на конденсатах Sup35NMGFP линейных отростков (состоящих из амилоидных фибрилл), а также увеличивает частоту прионной конверсии белка Sup35, связанной с затвердеванием конденсатов.

Выводы. Сверхпродукция шаперонов Ssa1 и Ydj1 ускоряет амилоидизацию белка Sup35NM-GFP и увеличивает частоту прионной конверсии, в то время как сверхпродукция Hsp104 не влияет заметного влияния на данные процессы.

МБ14. Возможная связь моноамин-индуцированной гетерологической сенситизации мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с клеточными циркадными ритмами

Д.Х. Исмаилова (diana15love@gmail.com)¹, В.В. Мазалов¹, В.И. Чечехин¹, Тюрин-Кузьмин П.А.¹

¹Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Циркадный ритм является важным регулятором физиологических процессов как на организменном, так и на тканевом уровне. Жировая ткань не является исключением – биологические часы регулируют многие процессы в ней, такие как адипогенез, термогенез, липолиз, побурение. В нашей лаборатории был открыт феномен гетерологической сенситизации (ГС) – это процесс, при котором стимуляция одного рецептора приводит к повышению функциональной активности другого рецептора. Частным случаем ГС является повышение чувствительности альфа-1-адренорецепторов при воздействии на серотониновые и норадреналиновые рецепторы в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках (ММСК) жировой ткани. Индукторы цАМФ-зависимого пути являются и активаторами ГС, и активаторами эндогенных циркадных ритмов *in vitro*.

В данной работе изучался уровень активности $\alpha 1$ -адренорецептор-зависимой кальциевой сигнализации (интенсивность ГС) в МСК при преинкубации с норадреналином и серотонином в ключевых временных точках эндогенного циркадного ритма на протяжении 24 часов для сопоставления ее с характеристиками внутриклеточных циркадных ритмов.

Методы. В исследовании использовались различные методы клеточной биологии: асептическое культивирование клеток эукариот, прижизненное окрашивание клеток, флуоресцентная микроскопия и др. Для обработки полученных данных использовались методы статистического анализа.

Результаты. В данной работе было показано, что при преинкубации с норадреналином уровень активности $\alpha 1$ -адренорецептор-зависимой кальциевой сигнализации в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках схож с динамикой экспрессии белка Per1, регулятора циркадных ритмов, описанной в литературе. При преинкубации с серотонином, выявленная динамика изменения чувствительности мультипотентных мезенхимных стромальных клеток к норадреналину не имела статистически значимых корреляций с временными характеристиками эндогенных циркадных ритмов. Это связано с существенной гетерогенностью интенсивности гетерологической сенситизации среди доноров.

Выводы. 1. Выявленная динамика ГС в ММСК при преинкубации с норадреналином во времени совпадает с динамикой экспрессии белка-регулятора циркадных ритмов Per1, описанной в литературе.

2. При преинкубации с серотонином, ввиду гетерогенности ГС среди доноров, динамика ГС в ММСК не имела статистически значимых корреляций с характеристиками циркадных ритмов.

МБ15. Роль p53 в чувствительности shh-медуллобластомы к иксабепилону и эрибулину

В.И. Жданкина (zhdankina.vicktoria@yandex.ru)¹, И.В. Камунина¹

¹Национальный исследовательский университет ИТМО, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Медуллобластома - это первичная эмбриональная опухоль мозга, которая классифицируется на 4 субгруппы. Одна из них - это SHH медуллобластома, составляющая треть от всех диагнозов этой опухоли. Ее стандартное лечение включает комбинацию резекции, радио- и химиотерапии, однако несмотря на комплексный подход к терапии, выживаемость пациентов остается в среднем на уровне 70%. В особенности выживаемость падает до 60%, если SHH-медуллобластома несет мутации в гене TP53. Во многих исследованиях было показано, что статус TP53 действительно имеют влияние на гибель клеток, опосредованную действием препаратов.

В данной работе на линиях Daoy (ATCC) с мутацией по p53 (C242F) и Daoy TP53 +/- были впервые протестированы ингибиторы микротрубочек - иксабепилон и эрибулин, ранее применявшиеся для метастатического рака молочной железы. Их активность сравнивалась с одобренным для медуллобластомы винкристином, для которого показаны пониженная проницаемость через гематоэнцефалический барьер, образование лекарственной устойчивости и нейротоксичность.

Методы. Оценка токсичности препаратов иксабепилона и эрибулина проводилась с использованием анализа с сульфородаминем В. Препарата-контроля винкристин. Клоногенный тест проводился для исследование пролиферативного потенциала опухолевых клеток после воздействия препаратов. Для определения механизм действия препаратов на клеточный цикл а также для идентификации типа клеточной гибели были применены методы проточной цитофлюориметрии и белкового иммуноблоттинга с использованием известных маркеров.

Результаты. Все три препарата имеют наномолярную концентрацию IC₅₀ в отношении Daoy, у иксабепилона - 0,9 нм, у эрибулина - 2,2 нм, у винкристина - 1,2 нм. После инкубации с двукратной концентрацией IC₅₀ иксабепилона и эрибулина в течение 24 часов большая часть клеток Daoy останавливается в фазе G2 клеточного цикла, а затем, через 48 часов, переходит в subG1 фракцию с фрагментированной ДНК. Используя окрашивание оксазолиевым желтым и пропидием йодидом, было также показано, что эта популяция клеток является апоптотической. Апоптоз был подтвержден расщеплением PARP на иммуноблоттинге. Результаты клоногенного теста также показали, что клетки, подвергшиеся действию иксабепилона и эрибулина в течение 48 часов, не восстанавливают свою способность к пролиферации после удаления препаратов.

Daoy TP53 +/- была получена с помощью CRISPR-Cas9 нокаута. В плазмиду lentiCRISPR v2 была клонирована гайдовая РНК между сайтами рестрикции Esp3I. Для проверки плазмиды на вставку использовалась эндонуклеаза рестрикции Pst. Отсутствие экспрессии у Daoy было подтверждено на уровне трансляции белковым иммуноблотом. Нокаут по p53 в Daoy привел к снижению IC₅₀ у иксабепилона (0,15 нм) и эрибулина (0,77 нм).

Выводы. Иксабепилон и эрибулин имеют схожую с винкристином эффективность в отношении клеточной линии Daoy, при этом снижая действующие концентрации при делеции p53.

МБ16. Изучение влияния паратиреоидного гормона на дифференцировочный потенциал культуры мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в условиях неконтактного сокультивирования

К.Ю. Комашко (*k.y.komashko@gmail.com*)¹, В.А. Усачёв¹, К.Ю. Кулебякин¹

¹*Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Костная ткань обновляется и восстанавливается на протяжении всей жизни человека. Это регулируется балансом между резорбцией и формированием новой костной ткани. Межклеточная коммуникация, осуществляемая эндокринными и паракринными сигналами, играет ключевую роль в синхронизации этих процессов.

Паратиреоидный гормон (ПТГ) является важным регулятором обмена костной ткани. Стимуляция ПТГ вызывает два типа ответов в культуре мезенхимальных стволовых клеток (МСК): плавное увеличение кальция или появление кальциевых осцилляций. Преобладание клеток с плавным приростом кальция, среди всех отвечающих на данный стимул клеток, приводит к усилению остеогенной дифференцировки, в то время, как преобладание клеток с осциллирующим ответом - к её ослаблению [1]. Как именно работает обнаруженный механизм межклеточной коммуникации на данный момент неясно.

В нашей работе мы оценили вклад паракринной сигнализации ПТГ на дифференцировку МСК при помощи модели неконтактного сокультивирования.

Методы. Исследование проводилось на культуре МСК жировой ткани в условиях неконтактного сокультивирования с добавлением паратиреоидного гормона. Успешность дифференцировки клеточной культуры в остеогенном направлении оценивали с помощью цитохимического окрашивания Ализариновым красным. Дифференцировка в адипогенном направлении определялась с помощью оценки накопления жировых капель с использованием флуоресцентного красителя Nile Red. Также проводили оценку уровня экспрессии генов остеогенеза и адипогенеза при помощи ПЦР в реальном времени. Для оценки эффективности дифференцировки в остеогенном направлении использовались маркеры RunX и остеокальцин, в адипогенном направлении - PPAR- γ и адипонектин.

Результаты. В ходе отработки нового метода неконтактного сокультивирования мы выявили, что ПТГ негативно влияет на направленность дифференцировки клеток в сторону адипогенеза. Анализ экспрессии генов, связанных с дифференцировкой в адипогенном направлении показал, что они были снижены в исследуемых лунках при сравнении с контрольными, в которых не было периодов добавления ПТГ.

Выводы. Был обнаружен моделирующий эффект ПТГ на дифференцировку в адипогенном направлении. Данные результаты открывают перспективы для более детального исследования регуляторных механизмов паратиреоидного гормона.

Литература

1. Kulebyakin, K., Tyurin-Kuzmin, P., Sozaeva, L., Voloshin, N., Nikolaev, M., Chechekhin, V., Vigovskiy, M., Sysoeva, V., Korchagina, E., Naida, D., et al. Dynamic Balance between PTH1R-

Dependent Signal Cascades Determines Its Pro- or Anti-Osteogenic

МБ17. Участие компонентов рiРНК системы — Vasa и Rhino — в поддержании ранних герминальных клеток в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*

И. А. Комбаров (ilkambarov9192@gmail.com)^{1,2}, В. Е. Адашев¹, Л. В. Оленина¹, А. А. Котов¹

¹Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Россия, Москва

²Кафедра биохимии, Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Герминальные клетки ранних стадий (герминальные стволовые клетки — ГСК) обеспечивают гаметогенез у животных и поддержание этих клеток необходимо для фертильности особей. рiРНК путь, подавляющий активность транспозонов в гонадах, является одним из важных механизмов контроля гаметогенеза. Мутации в компонентах рiРНК пути, например в генах *vasa* и *rhino*, приводят к мобилизации транспозонов и нарушениям оогенеза у *Drosophila melanogaster*. Но влияние *vasa* и *rhino* на сперматогенез изучено недостаточно. Предмет нашего исследования — изучение влияния белков Vasa и Rhino на поддержание ГСК в семенниках *D. melanogaster*.

Методы. Оценку морфологии семенников и популяций герминальных клеток самцов линий *Drosophila*, мутантных по *vasa* или *rhino*, проводили с помощью флуоресцентной микроскопии и Вестерн-блот анализа. Количество случаев апоптоза оценивали методом TUNEL.

Результаты. У самцов *D. melanogaster* с мутацией по гену *vasa* происходит снижение количества ГСК по сравнению с контролем дикого типа, начиная с 6-дневного возраста. Также семенники таких мух имеют меньший размер по сравнению с контрольными. Введение дополнительной копии гена *rhino* на фоне мутации *vasa* приводит к восстановлению размера семенников и количества ГСК до уровня, близкого к норме. Также на фоне мутации *vasa* статистически значимо не происходит увеличения частоты случаев апоптоза в герминальных клетках ранних стадий, включая ГСК.

Выводы. Vasa участвует в поддержании ГСК в сперматогенезе *D. melanogaster*. Наблюдается фенотипическое сходство в семенниках *D. melanogaster* на фоне мутаций по *rhino* и *vasa*. Дополнительная экспрессия *rhino* на фоне отсутствия *vasa* приводит к восстановлению нормальной морфологии семенников и количества ГСК. На фоне мутации *vasa* не происходит увеличения количества апоптозов герминальных клеток ранних стадий, включая ГСК, что говорит о том, что их потеря не связана напрямую с депрессией мобильных элементов.

МБ18. Роль экспрессии генов, кодирующих факторы агрегации, в механизме гистосовместимости у *Halisarca dujardini*

И.В. Копылова (ikopylova.msu@gmail.com)^{1,2}, Р.Ю. Бетенькова^{3,4}, А.Н. Богомазова¹, Т.В. Неретина⁵, А.И. Лавров⁵

¹ФГБУ ФНКЦ ФХМ имени Ю. М. Лопухина ФМБА России, Россия, Москва

²Кафедра иммунологии, Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

⁴Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

⁵Беломорская биологическая станция имени Н.А. Перцова, Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Губки обладают выраженной способностью к регенерации. Для её моделирования применяют реагрегацию диссоциированных клеток. Было показано, что у большинства исследованных видов губок клетки реагрегируют видоспецифично. На молекулярном уровне это обусловлено внеклеточными комплексами «факторов агрегации» (ФА). По химической природе это протеогликаны, обладающие линейной или розетковидной структурой за счёт наличия особого Wreath-домена. Было продемонстрировано, что некоторые губки способны к аллогенному распознаванию («свое-чужое»). Работы Fernandez-Busquets и соавторов указывают на ведущую роль ФА в данном процессе, так как 1) для ФА характерна высокая степень полиморфизма; 2) РНК ФА и сам белок накапливаются в области контакта трансплантатов. Тем не менее, точный механизм регуляции распознавания не установлен.

Методы. С помощью транскриптомных данных, полученных для обыкновенной губки Белого моря *Halisarca dujardini*, были выбраны три гена, кодирующих белки с характерной для ФА структурой. Методом секвенирования по Сэнгеру были валидированы последовательности, полученные при РНК-секвенировании. Были проведены эксперименты по трансплантации, на различных временных точках из аллогенных и аутологичных пар была выделена РНК. Анализ экспрессии генов проводили при помощи количественной ПЦР, сопряжённой с обратной транскрипцией.

Результаты. Мы наблюдали начало приживания аутологичных трансплантатов через 12 часов инкубации. Спустя сутки аутологичные образцы тканей полностью срастались, а аллогенные оставались несросшимися. Было показано, что экспрессия двух из трёх генов-кандидатов повышается через 12 часов после начала эксперимента как в аллогенных, так и в аутологичных парах. Также, повышение экспрессии этих генов происходит в ответ на прокальвание ткани, однако это не связано с процессом регенерации. По результатам статистического анализа, в аутологичных парах экспрессия трёх генов-кандидатов в среднем достоверно выше, чем в аллогенных парах. Тем не менее, у ряда особей экспрессия отдельных генов-кандидатов в аллогенных парах превышала уровень экспрессии в аутологичных парах.

Выводы. По нашим сведениям, это первые данные о системе гистосовместимости у *H. dujardini*. Была продемонстрирована корреляция приживания аутологичных трансплантатов и повышения уровня экспрессии трёх генов, кодирующих белки с Wreath-доменом.

МБ19. Генетическая и антигенная характеристика ускользящих мутантов вируса гриппа А/Н7N9

Н. В. Копылова (st078279@student.spbu.ru)^{1,2}, О. С. Коннева^{1,2}, Ю. А. Дешева²

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

²ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Вирусы птичьего гриппа А/Н7N9 продолжают циркулировать и эволюционировать, представляя угрозу для здоровья человека и птицеводства. Антигенный дрейф способствует появлению новых генотипов с измененными антигенными свойствами, ускользящих от приобретенного иммунитета хозяина. Поэтому важно не только осуществлять эффективный мониторинг за циркуляцией возбудителя, но и изучить появление возможных мутаций вследствие иммунного давления.

Цель исследования. Клонирование эскейп-мутантов вирусов гриппа А/Н7N9 А/Hong Kong/125/2017 IDCDC-RG56B и А/Guangdong/17SF003/2016 IDCDCRG56N, анализ биологических свойств полученных клонов.

Методы. Для клонирования эскейп-мутантов вирусов гриппа А/Н7N9

А/HongKong/125/2017 IDCDC-RG56B и А/Guangdong/17SF003/2016 IDCDCRG56N были использованы 10-дневные куриные эмбрионы, в присутствии моноклональных антител (Mab) к нейраминидазе N9 NA9-Вас mAb#8, NA9-Вас mAb#38, NA9-Вас mAb#40, предоставленными Тайваньской стороной. Для проведения молекулярно-генетического анализа N9 проводили одношаговую ПЦР в реальном времени со специально разработанными праймерами к N9. Для изучения биологических свойств эскейп-мутантов после одного пассажа на куриных эмбрионах анализировали геммагглютинирующую активность вирусов и их ростовые характеристики (EID50).

Результаты. С использованием Mab был получен ряд эскейп-мутантов вирусов гриппа А/Н7N9 А/Hong Kong IDCDC-RG56B и А/Guangdong/17SF003/2016 IDCDC-RG56N. По результатам РГА были отобраны клоны: А/Hong Kong: 7/1, 7/3, 7/4, 7/5, 7/6, 8/2, 8/3, 8/5, 8/6; А/Guangdong: 7/4, 8/1, 8/4. Репродуктивная активность клона А/Guangdong 8/4 (EID50 9,5 lg) оказалась гораздо выше репродуктивной активности клона А/Guangdong 8/1 (EID50 5,5 lg) и исходного штамма А/Guangdong/17SF003/2016 (EID50 7,5lg). В свою очередь клон А/Hong Kong 8/6 продемонстрировал снижение репродуктивной активности по сравнению с исходным штаммом. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей NA вирусов А/Н7N9 продемонстрировало, что области охватываемые используемыми праймерами, включают вариабельные участки.

Выводы. Молекулярно-генетический анализ последовательностей исходных штаммов и полученных клонов указывает на изменения в антигенной структуре нейраминидазы вирусов эскейп-мутантов А/Н7N9, что также подтверждается анализом биологических свойств полученных клонов.

МБ20. Подбор методов иммортализации первичных клеток почки обыкновенных игрунок (*Callithrix jacchus*)

Н.С. Куприянова (*kupriyanovans16@gmail.com*)

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

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Россия, Москва

Введение. Обыкновенные игрунки (*Callithrix jacchus*, ОИ) широко используемый вид лабораторных приматов. Существующая панель клеточных линий ОИ недостаточна и в основном представлена эмбриональными стволовыми клетками

Цель: Подобрать метод иммортализации первичных клеток почки ОИ.

Методы. Путем трипсинизации почки мертворожденного детеныша ОИ были получены первичные клетки. Для них был определен предел и время удвоения. С использованием лентивекторов, кодирующих ген *gfp* под контролем различных промоторов: PGK, CMV или EF1, без или с добавлением полибрена, был оптимизирован протокол трансдукции клеток ОИ. Путем лентивирусной трансдукции частицами, кодирующими *E6*, *E7 HPV16*, *rtet* (*Rattus norvegicus*), *hTERT* (*Homo sapiens*) были получены варианты клеток, кодирующих гены *rtet*, *hTERT*, *E6,E7 HPV16* или *hTERT* в сочетании с *E6*, *E7 HPV16*. Селекцию *E6*, *E7*- и *hTERT*-положительных клеток проводили в присутствии пуромицина (0,75мкг/мл). Анализ теломеразной активности проводили методом RTA относительно линии MCF-7. Уровень продукции р53 оценивали методом Вестерн блот.

Результаты. Была получена первичная клеточная культура, для которой время удвоения на первой недели ведения - $42,83 \pm 23,46$ часов, а на более поздних этапах - $74,46 \pm 26,23$. Предел удвоения популяции - $5 \pm 0,2$. Исследованные промоторы обладают одинаковой эффективностью, добавление полибрена повышает эффективность трансдукции. Трансдукция лентивирусами, кодирующими *E6*, *E7 HPV16*, *hTERT*, *rtet* или *E6,E7 HPV16* в сочетании с *rtet* не приводит к иммортализации первичных клеток ОИ. Только последовательная трансдукция лентивирусами, кодирующими *E6*, *E7 HPV16* и *hTERT* приводит к продолжению времени культивации клеток (до 6 месяцев), но не иммортализации клеток.

Выводы. Использование стандартных иммортализирующих агентов (*E6,E7 HPV16*, *TERT* различной природы) не приводит к иммортализации первичной культуры клеток почки ОИ. Для дальнейшей работы необходимо выбирать другие методы иммортализации.

МБ21. Подбор способа созревания кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека, для получения релевантной клеточной модели кардиомиопатии

К.А. Лаврентьева (kris.lavr@gmail.com)¹, А.П. Богомолова^{2,3}, И.А. Катруха^{2,3}, Д.В. Голиусова^{1,4}, А.Н. Богомазова^{1,5}

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Россия, Москва

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³HuTest Ltd, Finland, Turku

⁴Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, Москва

⁵Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКИЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина, Россия, Москва

Введение. Кардиомиопатия - это патология сердца, которая приводит к нарушению функций и структуры миокарда. Болезнь может вызывать серьезные осложнения, включая легочную гипертензию и сердечную недостаточность. Разработка клеточных моделей на основе кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека (ИПСК-КМ), имеет значительный потенциал для изучения патогенеза заболевания и разработки новых методов терапии. Однако, в процессе дифференцировки полученные кардиомиоциты проявляют свойства, характерные для фетальных клеток, которые могут не полностью отражать фенотип патологии [1]. В связи с этим целью нашей работы является поиск способа созревания ИПСККМ для получения релевантной клеточной модели кардиомиопатии. Для оценки степени зрелости кардиомиоцитов мы использовали соотношение медленной скелетной (ssTnI) и сердечной изоформ тропонина I (cTnI) [1].

Методы. Две линии ИПСК здоровых доноров дифференцировали в кардиомиоциты с помощью коммерческого набора сред STEMdiff™ Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Kit (STEMCELL Technologies) и далее культивировали в ростовой среде STEMdiff™ Cardiomyocyte Maintenance Medium того же производителя с различными добавками: 1) триодтиронин, дексаметазон, инсулин-подобный фактор роста 1 или 2) этопозид, и без добавок (контроль). Клеточные культуры анализировали методами ИЦХ и сэндвич-ИФА на экспрессию ssTnI и cTnI на уровне белка.

Результаты. Нами были получены две линии кардиомиоцитов, способных к спонтанному сокращению *in vitro*. Было показано, что все исследуемые культуры кардиомиоцитов положительно окрашиваются на cTnI и ssTnI и демонстрируют соотношение $cTnI : ssTnI < 1$. В исследуемых и контрольных образцах преобладает ssTnI, что характерно для фетальных кардиомиоцитов. Результаты были идентичны для двух разных линий кардиомиоцитов.

Выводы. Использованные нами протоколы созревания кардиомиоцитов *in vitro* не привели к сдвигу соотношения $cTnI : ssTnI$ в сторону более зрелых клеток.

Результаты воспроизводятся на двух независимых линиях кардиомиоцитов.

Требуется увеличение сроков культивирования клеток в среде для созревания и тестирование дополнительных факторов созревания кардиомиоцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-25-00456.

Литература

1. Bedada, F. B., Chan, S. S., Metzger, S. K., Zhang, L., Zhang, J., Garry, D. J., Kamp, T. J., Kyba, M., & Metzger, J. M. (2014). Acquisition of a quantitative, stoichiometrically conserved ratiometric marker of maturation status in stem cell-derived cardiac myocytes, Stem Cell Rep. 3, 594–605.

МБ22. Морфофункциональные различия CD14⁺⁺ и CD16⁺⁺ субпопуляций моноцитарных макрофагов

О.А. Лазарева (ol9ala.lazareva@yandex.ru)^{1,2}, Н.А. Савин³, Д.В. Колесов^{4,5}, А.И. Астахова⁵, П.А. Вишнякова^{2,4}

¹Кафедра клеточной биологии и гистологии, Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва ²Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Россия, Москва

³Национальный исследовательский технологический университет МИСИС, Россия, Москва

⁴Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова, Россия, Москва

⁵Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Россия, Москва

Введение. В настоящее время известно, что популяция моноцитов человека гетерогенна. В ней выделяют три субпопуляции: классические CD14⁺⁺CD16⁻, промежуточные CD14⁺CD16⁺ и неклассические CD14⁻CD16⁺⁺ моноциты, для каждой из которых характерны свои функции и свойства [1]. Обобщённая оценка вклада макрофагов, происходящих из разных субпопуляций моноцитов, в воспалительный процесс может привести к накоплению ошибочных фактов об их физиологии. Поэтому целью нашего исследования стало изучение морфофункциональных особенностей CD14⁺⁺ и CD16⁺⁺ макрофагов моноцитарного происхождения.

Методы. В ходе исследования из первичных моноцитов человека, полученных из крови трёх здоровых доноров с помощью центрифугирования в градиенте плотности, методом магнитного сортирования выделяли две субпопуляции клеток: CD14⁺⁺ и CD16⁺⁺. Дифференцировку моноцитов в макрофаги индуцировали добавлением макрофагального колониестимулирующего фактора в культуральную среду. Клетки инкубировали в течение 7 дней. Оценивали топографию клеточной поверхности и модуль Юнга живых клеток посредством ионно-силового микроскопа. Методом STED анализировали морфологию актина, предварительно окрашенного фаллоидином с родаминовой меткой. Профиль цитокинов после провоспалительной стимуляции липополисахаридом (ЛПС) оценивали мультиплексным анализом.

Результаты. Выявлено, что CD16⁺⁺ макрофаги имеют значимо меньший модуль Юнга в сравнении с CD14⁺⁺ макрофагами. Показано, что на периферии клетки присутствуют актиновые фибриллы, в то время как в центральной части наблюдаются скопления глобул актина. Добавление ЛПС вызывало секрецию про- и противовоспалительных цитокинов CD14⁺⁺ макрофагами, ответ CD16⁺⁺ макрофагов был менее интенсивным.

Выводы. Полученные данные позволяют сделать вывод, что CD14⁺⁺ и CD16⁺⁺ субпопуляции макрофагов морфофункционально неоднородны.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 22-15-00241).

Литература

1. Vishnyakova, P. et al. (2021) The response of two polar monocyte subsets to inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111614.

МБ23. Изучение тимусной селекции при помощи анализа данных секвенирования репертуара Т-клеточных рецепторов

Д.В. Луппов (luprov.dv@phystech.edu)^{1,2}, Е.К. Власова^{3,2}, М.А. Шугай²

¹Московский физико-технический институт, Россия, Долгопрудный

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Россия, Москва

³Национальный исследовательский университет ИТМО, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Тимусная селекция - сложный процесс, в результате которого у человека формируется репертуар Т-клеток, рецепторы которых с одной стороны способны распознавать патогены, с другой - не вызывают аутоиммунной реакции на собственные ткани. Это накладывает ограничения на разнообразие Т-клеточных рецепторов (ТКР), особенно на их CDR3 фрагменты, непосредственно контактирующие с пептидом в комплексе с МНС. Последние разработки в области секвенирования нового поколения позволяют одновременно прочитывать большое количество последовательностей ТКР, тем самым формируя представление об их разнообразии. В этой работе мы исследовали эти данные для того, чтобы изучить свойства ТКР, влияющие на успешное прохождение селекции. Также эта работа касается аллелей HLA, как фактора тимусной селекции.

Методы. В качестве модели репертуара ТКР, не подверженных любого рода селекции, использованы данные, сгенерированные ПО OLGA, симулирующим VDJ рекомбинацию. В качестве репертуара наивных клеток использованы различные наборы данных периферийных одноядерных клеток крови, из которых, для избежания эффекта клональной экспансии, удалены клоны, которые встречались более 1го раза. Помимо этого, использованы данные секвенирования Double Positive (DP) и CD8+ тимоцитов. Для анализа последовательностей ТКР использован Python. Для анализа физико-химических свойств CDR3 использована библиотека Python Peptides. Для анализа обогащения функциональных кластеров ТКР использовано ПО VDJtools. В анализ включены данные одиночного секвенирования клеток из 3х датасетов объединенные с данными секвенирования ТКР. Для демонстрации влияния HLA аллелей на селекцию использован набор данных секвенирования ТКР 3х пар близнецов. Для моделирования структур ТКР использовано программное обеспечение TCRmodel.

Результаты. В результате анализа выявлено, что для бета CDR3 происходит уменьшение встречаемости таких аминокислот (АК) как пролин и положительно-заряженных АК. Анализ встречаемости Змеров показал, что Змеры с цистеином, а также сайты гликозилирования значительно уменьшают вероятность прохождения селекции. Анализ физических свойств показал уменьшение заряда и объема CDR3, и увеличение гидрофобности (только для бета цепи) после селекции. Гибкие последовательности обогащены после селекции. Показано, что CDR3 фрагмент является определяющим фактором для дальнейшей дифференциации тимоцита, как на уровне своей структуры, так и на уровне последовательности. Показано влияние аллелей HLA на тимусную селекцию.

Выводы. Нами был разработан подход к характеристике и сравнению репертуаров ТКР, который мы применили для изучения тимусной селекции, выделив ряд свойств, влияющих на этот процесс. Наши результаты имеют потенциал для улучшения дизайна ряда иммунотерапий, а также в изучении аутоиммунных заболеваний.

МБ24. Биологические свойства вакцинных кандидатов на основе ЖГВ подтипа H1N1pdm09

И.В. Майорова (st076107@student.spbu.ru)^{1,2}, А.Р. Рекстин², Т.А. Котомина², А.С. Матушкина², Ю.А. Дешева²

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

²ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Вторичная бактериальная инфекция *Streptococcus pneumoniae* обуславливает многие случаи смерти, связанные с гриппом. Помимо бактериальных полисахаридов, в качестве мишеней для разработки бактериальных вакцин используются защитные поверхностные белки бактерий. В ФГБНУ «ИЭМ» сконструирован химерный белок PSPF, включающий консервативные фрагменты поверхностных белков *S. pneumoniae*: PspA, Spr1875 и PsaA, который обладал высокой иммуногенностью у мышей и вызывал защиту от вирулентных штаммов *S. pneumoniae*. Использование смеси живой гриппозной вакцины и белка PSPF при интраназальном введении эффективно предупреждало развитие пневмококковой и гриппозной инфекций, снижая вероятность трансформации первичной сублетальной инфекции в летальную.

В данной работе впервые были изучены биологические свойства рекомбинантного вируса гриппа на основе вакцинного штамма живой гриппозной вакцины (ЖГВ) A/17/Южная Африка/2013/01(H1N1)pdm09, экспрессирующего фрагмент белка Spr1875 *S. pneumoniae*, присоединенного гибким линкером к поверхностному белку вируса — гемагглютинину.

Методы. Изучение ростовых характеристик химерного вируса проводили в развивающихся куриных эмбрионах (ЭИД50). Протективную активность против инфекции вирусом гриппа A/Калифорния/09/07(H1N1)pdm09, адаптированного к мышам, изучали на мышах линии СВА.

Результаты. Было установлено, что рекомбинантный штамм способен к росту в куриных эмбрионах, сохраняя при этом температурочувствительный фенотип, характерный для вакцинных вирусов. При интраназальном введении мышам химерная вакцина H1-Spr-69 демонстрировала ограниченный рост по сравнению с исходным вакцинным вирусом A/H1N1pdm09. При экспериментальной инфекции иммунизированных мышей показано статистически значимое снижение титров инфекционного вируса в группах, иммунизированных вакцинными штаммами A/H1N1pdm09 и H1-Spr-69 по сравнению с неиммунизированными животными.

Выводы. В дальнейших исследованиях будет изучена защитная эффективность рекомбинантной векторной вакцины против вирус-бактериальной инфекции.

Работа выполнена в рамках темы фундаментальных научных исследований (FGWG-2022-0001).

Литература

1. Suvorov A, Dukhovlinov I, Leontieva G, Kramskaya T, Koroleva I, et al. (2015) Chimeric Protein PSPF, a Potential Vaccine for Prevention Streptococcus pneumoniae Infection. J Vaccines Vaccin 6: 304. doi: 10.4172/2157-7560.1000304

МБ25. Изучение влияния микроокружения на регенеративную способность мезенхимных стромальных клеток

В.А. Мангушева (veronikamanguseva@gmail.com)¹, А.О. Монакова^{1,2}, В.С. Попов^{1,2}, Н.А. Басалова^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{1,2}

¹Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Важным условием для функционирования стволовых клеток является особое микроокружение - ниша. При повреждении ниша способна к частичному восстановлению структуры и функции. Ключевыми участниками восстановления ниши могут являться мезенхимные стромальные клетки (МСК). Так, ранее было показано, что экзогенно введённые МСК преимущественно за счёт секретоста способствуют восстановлению ниши сперматогонимальной стволовой клетки (ССК). Однако роль резидентных МСК яичка в восстановлении ниши ССК остаётся малоизученной.

Методы. Для исследования роли резидентных МСК в нише ССК у мышей было смоделировано химиотерапевтическое повреждение сперматогенеза доксорубицином. Часть семенников от мышей с повреждением и интактных мышей анализировали с помощью иммуногистохимического окрашивания антителами на один из ключевых маркёров МСК CD90. Из другой части семенников выделяли клетки Лейдига и стромальную фракцию, содержащую МСК, а также выделяли МСК из жировой ткани. Секретом МСК, полученных из повреждённых и интактных семенников или из жира, добавляли к клеткам Лейдига мышей разных групп. На 4-й день отбирали среду с клеток Лейдига и измеряли концентрацию тестостерона методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Показано, что при повреждении количество CD90+ клеток в интерстиции семенников значительно возрастает. В *in vitro* модели концентрация тестостерона в среде клеток Лейдига в среднем на 15% больше при добавлении секретоста МСК семенников интактных животных, по сравнению с секретостом МСК, выделенных из повреждённых яичек. При этом концентрация тестостерона в среде клеток Лейдига, полученных от мышей с повреждением, была в среднем на 46% меньше при добавлении любого секретоста МСК. Секретом МСК жира значительно меньше по сравнению с секретостом МСК яичек стимулировал клетки Лейдига.

Выводы. Действие МСК на нишу оказалось тканеспецифичным. При повреждении количество МСК возрастает, однако их регенераторный потенциал, по видимому, снижается. При этом способность клеток Лейдига отвечать на стимулы при повреждении ухудшается, что может говорить о снижении потенциала ниши к восстановлению.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>), *in vivo* эксперименты) и в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (*in vitro* модель).

МБ26. Генетические механизмы развития параганглиом головы и шеи с мутацией SDHD:p.H102R

Д.С. Маркова (ddash-mark@yandex.ru)^{1,2}, М.С. Федорова², В.С. Павлов², А.В. Снежкина²

¹Кафедра молекулярной биологии, Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Лаборатория постгеномных исследований, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, Москва

Введение. Параганглиомы (ПГ) головы и шеи - редкие нейроэндокринные опухоли с высокой степенью наследственности. Данные опухоли являются медленно растущими и трудно диагностируются, а также характеризуются переменным потенциалом метастазирования, который невозможно прогнозировать. Изучение механизмов образования и прогрессии ПГ необходимо для развития новых эффективных методов диагностики и противоопухолевой терапии. Целью данной работы является оценка частоты варианта SDHD:p.H102R в выборке пациентов с ПГ головы и шеи и контрольной когорте здоровых индивидуумов, а также исследование генетических механизмов развития SDHD:p.H102R ассоциированных опухолей.

Методы. Выполнен анализ частоты варианта SDHD:p.H102R у 134 пациентов с ПГ головы и шеи и 373 здоровых индивидуумов с использованием таргетного секвенирования на платформе MiSeq Illumina. Оценка потери гетерозиготности (LOH) гена SDHD и других участков хромосомы 11 проводилась у 12 пациентов носителей мутации SDHD:p.H102R при помощи анализа 12 микросателлитных маркеров, микроделеций и метода анализа частоты аллеля В (BAF). Изучение роли геномного импринтинга в наследовании мутации выполнено с использованием анализа метилирования импринтируемых участков H19-DMR и KvDMR в области 11p15.5 методом таргетного высокопроизводительного секвенирования ферментативно конвертированной ДНК.

Результаты. Частота мутации SDHD:p.H102R среди пациентов составила 9%, при этом вариант встречался в 34% случаев SDHD-мутантных опухолей. В когорте здоровых индивидуумов, вариант SDHD:p.H102R обнаружен с частотой 1,6%. Это позволяет характеризовать данный вариант как патогенный (на основе значения OR и классификации ACMG). На хромосоме 11 выявлены многочисленные микроделеции и высокая частота LOH для 11 из 12 исследованных микросателлитных маркеров. С помощью BAF-анализа показана потенциальная потеря хромосомы 11. Анализ дифференциально метилированных областей H19-DMR и KvDMR, импринтируемых по материнской и отцовской копии хромосомы 11, соответственно, выявил потерю материнской хромосомы 11 только у двух пациентов, при этом во всех опухолях показано гиперметилирование H19DMR.

Выводы. Высокая частота патогенного варианта SDHD:p.H102R свидетельствует о его важной роли в распространении наследственных ПГ головы и шеи в российской популяции. Частая потеря хромосомы 11 у пациентов с мутацией SDHD:p.H102R свидетельствует об инактивации второго аллеля гена. Результаты анализа метилирования импринтируемых участков в области 11p15.5 не противоречат гипотезе о роли геномного импринтинга в развитии SDHD-ассоциированных ПГ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 19-15-00419

МБ27. Поиск новых генов опсинов у двустворчатых моллюсков

Е.Е. Меньщикова (*menshchikovaeliza@gmail.com*)¹, П.А. Хорн¹, С.В. Баженов¹, И.В. Манухов¹, А.В. Мишин¹

¹Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, МФТИ (НИУ), Россия, Долгопрудный

Введение. Двустворчатые моллюски (*Bivalvia*) - класс беспозвоночных, известный с раннего палеозоя (более 500 млн. лет назад) насчитывающий около 20 тыс. видов. Представители *Bivalvia* - чувствительные биосенсоры и биоаккумуляторы, отличающиеся быстрыми эволюционными реакциями на изменения окружающей среды, что делает двустворчатых моллюсков интересным объектом для исследований. Детальное изучение уникальных механизмов адаптации двустворчатых моллюсков возможно через изучение мембранных белков этих организмов. Опсины - фоточувствительные мембранные белки, относящиеся к классу GPCR. Хорошо изучены опсины позвоночных, включенные в зрительную сенсорную систему, а также выполняющие различные невизуальные функции. Опсины беспозвоночных остаются малоизученными, и функции большинства из них не определены. Целью данной работы является поиск новых генов опсинов у двустворчатых моллюсков для дальнейшего исследования изменчивости этих белков внутри видов класса *Bivalvia*.

Методы. Образцы моллюсков собирали с разных мест о. Оленевский на Белом море (66.516331, 33.078367), всего 23 образца. Выделение геномной ДНК проводили согласно протоколу из статьи Сидорука и др.. Оценку качества выделенной ДНК и оценку длины/концентрации продуктов ПЦР проводили стандартно методом ДНК-электрофореза в агарозном геле (1%). Методом ПЦР с использованием специфичных праймеров к гену, кодирующему опсин (OPN4) у *M. edulis*, проводили амплификацию 2-х целевых участков. В качестве контрольного образца использовали ДНК из *M. edulis* (геном расшифрован). В качестве полимеразы использовали Taq-полимеразу (Евроген), ПЦР проводили согласно стандартной методике.

Результаты. Собранные образцы двустворчатых моллюсков по фенотипу отнесли к 3 видам *Bivalvia*: *M. edulis* (контрольный образец), *M. arenaria*, *M. balthica* и один образец идентифицировать не удалось (вид X). Из собранных образцов успешно выделили геномную ДНК, анализ которой проводили с помощью ПЦР с использованием двух пар праймеров, специфических к консервативным участкам последовательности гена опсина (OPN4) *M. edulis*. ДНК-электрофорез ПЦР-продуктов с использованием первой пары праймеров показал в 2 раза отличающуюся длину ПЦР-продукта у образца вида X в сравнении с контрольным образцом (1500 п.о. против 700 п.о.). Длина ПЦР-продуктов других образцов не отличалась от таковой у контрольного образца, за исключением образцов из *M. balthica*, ПЦР ДНК которых не дала специфического продукта.

Выводы. ПЦР выделенной геномной ДНК исследуемых образцов двустворчатых моллюсков видов *M. edulis*, *M. arenaria*, *M. balthica* с использованием праймеров к гену OPN4 дала специфический продукт для всех образцов, кроме *M. balthica*. ПЦР-продукт ДНК образца вида X отличается по длине от контрольного образца. Полученные данные требуют проведения дальнейших исследований.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-03-2024-117, проект № FSMG-20240012).

МБ28. Т-кадгерин как негативный регулятор адипогенеза

М.Д. Мещеряков (m903445888@mail.ru)¹, А.А. Щипова¹, В.Ю. Сысоева¹, П.С. Климович^{1,2}, К.А. Рубина¹

¹Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт экспериментальной кардиологии, НИИЦ Кардиологии им. Чазова Минздрава России, Россия, Москва

Введение. Жировая ткань продуцирует большое количество гормонов, одним из которых является адипонектин, регулирующий метаболизм и чувствительность клеток к инсулину. Одним из рецепторов адипонектина является Т-кадгерин, атипичный представитель семейства кадгеринов. Т-кадгерин экспрессируется в сосудах, нервной ткани, а также в жировой ткани. Однако в последней его функции не известны. Мы предположили, что Т-кадгерин может выступать в качестве регулятора адипогенеза, поэтому целью нашей работы стало оценить влияние Т-кадгерина на дифференцировку преадипоцитов.

Методы. В исследовании мышинные клетки преадипоцитов 3T3-L1 дикого типа, с гиперэкспрессией Т-кадгерина (3T3 T-Cadh[↑]) и клетки, трансфецированные пустым вектором в качестве контроля плазмидной трансфекции, культивировали в плотном монослое в среде ДМЕМ с низким содержанием глюкозы после чего запускали в адипоцитарную дифференцировку путем добавления инсулина, дексаметазона и IBMX. Среду меняли каждые 2 дня. На 3, 7, 9 день дифференцировки из клеток выделяли мРНК и методом ПЦР в реальном времени анализировали маркеры ранней (СЕВР- α , СЕВР- β , PPAR- γ) и поздней адипоцитарной дифференцировки (ADIPOQ). Дополнительно клетки окрашивали Nile Red, детектирующим липиды, после чего подсчитывали процент дифференцированных клеток при помощи флуоресцентной микроскопии.

Результаты. Анализ полученных данных показал, что экспрессия мРНК адипонектина появляется на 7 день дифференцировки во всех типах клеток, однако ее уровень в 3T3 T-Cadh[↑] в 1,7 раза и 2 раза ниже ($p < 0,05$), чем в клетках с контрольной плазмидой и клетках дикого типа соответственно. Значимая разница сохранялась и на 9 день дифференцировки: уровень экспрессии мРНК адипонектина в контрольных клетках продолжал расти и был в 5 раз выше, чем в клетках 3T3 T-Cadh[↑]. Уровень экспрессии мРНК PPAR- γ начинает расти уже на 3 день дифференцировки во всех клетках, однако его уровень в 2,7 раза ниже в клетках 3T3 T-Cadh[↑] по сравнению с контролем. По СЕВР- α и СЕВР- β разницы не наблюдалось. При обсчете количества дифференцированных клеток после окрашивания Nile Red оказалось, что данный показатель в 8 раз ниже в клетках с гиперэкспрессией Т-кадгерина ($p < 0,05$).

Выводы. Результаты исследования позволяют предположить, что клетки с гиперэкспрессией Т-кадгерина хуже дифференцируются в адипоцитарном направлении, из чего можно сделать вывод, что Т-кадгерин является негативным регулятором адипогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-11-00205

МБ29. Исследование взаимодействия hsa-miR-101 и кластера miR 371~373

К.В. Мидакова (kmidakova@mail.ru)^{1,2}

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

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

Введение. МикроРНК играют ключевую роль в регуляции генной экспрессии путем взаимодействия с 5' UTR или 3'UTR мРНК. Однако известно, что микроРНК (miR) также способны регулировать экспрессию друг друга. Исследования взаимодействия микроРНК, путем связывания miR с pri-miR или регуляции транскрипционных факторов, имеют важное значение для разработки микроРНК-направленных терапий. С использованием биоинформатических методов было обнаружено, что сниженный уровень hsa-miR-101 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы может привести к увеличению экспрессии кластера miR 371~373. Цель нашего исследования заключалась в подтверждении этого влияния и определении возможного воздействия повышенного уровня кластера miR 371~373 на экспрессию hsa-miR-101.

Методы. Методами молекулярного клонирования была создана плаزمида, содержащая ген MIR101 с инвертированными повторами на обоих концах. С помощью плазмиды, кодирующей транспозазу PiggyBac, мы создали линию с оверэкспрессией hsa-miR-101. Для получения линий с оверэкспрессией кластера miR 371~373 мы выбрали гидовые РНК для dCas9, связанного с транскрипционным активатором VP64. Изменения экспрессии микроРНК были установлены с помощью ПЦР в реальном времени.

Результаты. Линии с оверэкспрессией hsa-miR101 демонстрировали увеличение экспрессии микроРНК кластера miR 371~373. Однако, в линиях с оверэкспрессией кластера miR 371~373 не наблюдалось изменение экспрессии hsa-miR-101. Были выявлены различия в уровне экспрессии микроРНК в составе кластера: экспрессия miR-371 оказалась ниже по сравнению с miR-372 и miR-373.

Выводы. Полученные результаты подтверждают предварительные биоинформатические данные и указывают на то, что микроРНК кластера miR 371~373 не оказывают влияния на экспрессию hsa-miR-101.

Работа выполнена в рамках проекта РФФ № 21-74-10154.

МБ30. Нокаут гена UBE2A связан со снижением экспрессии генов комплекса немышечного миозина в нейрональных клетках предшественниках, дифференцированных из ИПСК

Р.В. Миронов (mausekoenig@yandex.ru)^{1,2}, Е.К. Секретова¹, П.Е. Фомин¹, А.В. Федоренко¹

¹Лаборатория клеточной биологии, ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина, Россия, Москва

²Кафедра иммунологии, биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. X-сцепленный синдром умственной отсталости по типу Насименто связан с мутациями в гене убиквитин-конъюгирующего фермента UBE2A. Известно, что этот белок участвует в митофагии, в репарации ДНК, а также в регуляции транскрипции при элонгации, осуществляющейся с помощью моноубиквитинирования гистона

H2B (H2Bub). Однако в настоящее время неизвестно, какую роль фермент UBE2A играет в нейрогенезе.

Методы. Для изучения роли *UBE2A* в развитии синдрома Насименто была получена изогенная модельная система на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), включающая линии с нокаутом и индуцибельной оверэкспрессией гена *UBE2A*, а также ИПСК, репрограммированные из клеток пациента с синдромом Насименто. Все линии ИПСК были дифференцированы в нейрональные предшественники (НП) и глиальные клетки.

Ранее мы показали, что нокаут гена *UBE2A* приводит к нарушению клеточной подвижности глиальных производных ИПСК. При помощи полногеномного секвенирования мРНК мы выявили снижение экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию актомиозиновой сократимости в нейтральных производных с нокаутом *UBE2A*. Задачей данной работы являлась валидация полученных данных РНК-секвенирования, в частности изучение влияния нокаута гена *UBE2A* на экспрессию генов комплекса немышечного миозина.

Результаты. Методом количественной ОТ-ПЦР мы подтвердили в том, что в НП с нокаутом гена *UBE2A* действительно снижена экспрессия различных изоформ легких (*MYL12B*, *MYL9*) и тяжелых (*MYH9*, *MYH14*, *MYH7*) цепей немышечного миозина II. При этом, в ИПСК и глиальных клетках, нокаутных по *UBE2A*, эти изменения были выражены значительно слабее. Методом иммуноблоттинга мы подтвердили значительное снижение содержания H2Bub в нокаутных НП при том, что в ИПСК и глии данная гистоновая модификация практически не выявлялась.

Выводы. Таким образом, в НП с нокаутом гена *UBE2A* действительно снижена экспрессия генов немышечного миозина, что может частично объяснять нарушения подвижности клеток, нокаутных по гену *UBE2A*. Наблюдаемое снижение экспрессии генов немышечного миозина в нокаутных НП может быть связано с нарушением регуляции транскрипции через H2Bub.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 21-65-00017

МБ31. Разработка низкомолекулярных ингибиторов Р-гликопротеина на основе пентациклических тритерпеноидов для терапии опухолей с фенотипом множественной лекарственной устойчивости

А.Д. Моралев (arseniimoralev@gmail.com)^{1,2}, А.В. Марков¹

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

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

Введение. В настоящее время одной из актуальных проблем в химиотерапии онкологических заболеваний является развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухолевых клеток, снижающее эффективность применяемых препаратов. Один из ключевых механизмов формирования данного состояния связан с гиперэкспрессией эффлюксных транспортеров семейства ABC, наиболее изученным и охарактеризованным среди которых является Р-гликопротеин (Р-гр). Несмотря на активную разработку новых ингибиторов Р-гр, данные соединения до

сих пор не применяются в клинике из-за ряда побочных эффектов. Данная проблема может быть скорректирована использованием природных метаболитов в качестве стартового материала для синтеза.

Методы. Разработка ингибиторов P-gr включала молекулярное моделирование связывания библиотек амидов солоксолон (8 соединений) и оксадиазолов глицирретовой кислоты (22 соединения) с активным сайтом P-gr, верификацию выявленных лидерных соединений на моделях клеток карциномы шейки матки человека KB-8-5 и лимфосаркомы мышцы RLS40 с фенотипом МЛУ и гиперэкспрессией P-gr: оценивали влияние на внутриклеточное накопление родамина123 (Po-123) и доксорубина (Dox), синергическое цитотоксичное действие с Dox, влияние на уровень экспрессии P-gr.

Результаты. Идентифицированы N,N-диметиламин-содержащий амид солоксолон sg-650 и мета-пиридин-содержащий оксадиазол глицирретовой кислоты 2g способные напрямую взаимодействовать с активным сайтом P-gr и эффективно ингибировать его насосную функцию в клетках KB-8-5 и RLS40 в нетоксичных концентрациях, увеличивая внутриклеточное накопление Po123 и Dox, а также повышать чувствительность клеток KB-8-5 к цитотоксическому действию Dox. Дополнительно показано, что P-gr-опосредованное ингибирование транспорта Po123 и Dox под действием sg-650 в клетках KB-8-5 происходит конкурентно и бесконкурентно, соответственно, в результате взаимодействия тритерпеноида с модуляторным сайтом трансмембранного домена P-gr. Для 2g также показано отсутствие влияния на уровень мРНК и белка P-gr, что свидетельствует о прямом действии на транспортную активность переносчика.

Выводы. Таким образом, в данной работе мы продемонстрировали потенциал пентациклических тритерпеноидов в качестве перспективной платформы для разработки новых нетоксичных эффективных ингибиторов P-gr для терапии опухолей с фенотипом МЛУ, а также расширили представление о зависимости «структура-активность» для данных природных соединений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-14-00374.

МБ32. Роль компонентов опухолевого внеклеточного матрикса в регуляции эндотелиально-мезенхимного перехода в клетках эндотелия *in vitro*

В.О. Морева (00htf00@gmail.com)^{1,2}, С.В. Шабельников¹, А.Г. Миттенберг¹, Э.И. Александер-Синклер¹, Н.Б. Бильдюг¹

¹*Институт Цитологии Российской Академии наук, Россия, Санкт-Петербург*

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

Введение. Ангиогенез является важным фактором опухолевого роста, который способствует инвазии опухолевых клеток и метастазированию. При этом интенсивный рост сосудов сопровождается эндотелиально-мезенхимным переходом, при котором клетки эндотелия утрачивают свои исходные характеристики, приобретают миграционный фенотип и начинают экспрессировать некоторые маркеры мезенхимных и гладкомышечных клеток, ключевым из которых является гладкомышечный альфа-актин (α SMA). Данные литературы и наших предыдущих исследований указывают на то, что в поддержании роста сосудов важную роль

может играть опухолевое микроокружение. Поскольку известно, что формирование опухолей в различных органах и тканях сопровождается существенными изменениями внеклеточного матрикса (ВКМ), в задачи работы входила оценка признаков эндотелиально-мезенхимного перехода в клетках эндотелия при их культивировании на ВКМ, полученном от нормальных и опухолевых клеток.

Методы. Клетки эндотелия (HUVES), полученные из пупочной вены человека, культивировали на ВКМ, наработанном фибробластами кожи человека и клетками фибросаркомы человека (линии DF-2 и HT-1080 соответственно, ЦКП «КККП», Института цитологии РАН). Для оценки использовали методы Вестерн-блоттинга и масс-спектрометрии.

Результаты. Посредством Вестерн-блоттинга было показано, что в отличие от контрольных клеток HUVES, которые культивировали в отсутствие ВКМ, в клетках, культивируемых на матриксах от DF-2 и HT-1080, наблюдалось появление маркера α SMA, при этом ВКМ, полученный от клеток фибросаркомы, оказывал более выраженное влияние и вызывал значительное повышение уровня α SMA в клетках HUVES. Для того чтобы оценить, какие компоненты матрикса могут отвечать за этот эффект, проводили сравнительный анализ проб ВКМ, наработанного клетками DF-2 и HT-1080, с помощью масс-спектрометрии. Было показано, что ВКМ, полученный от клеток DF-2, включал α 1-, α 2- и α 3-цепи коллагена VI, а также фибронектин, которые практически отсутствовали в матриксе от клеток HT-1080. Напротив, в матриксе, полученном от клеток HT-1080, в отличие от клеток DF-2, были выявлены цепи ламинина β 3 и γ 2, которые, как известно, формируют изоформу ламинина 5 (α 3 β 3 γ 2). Ламинин-5 является белком базальной мембраны, который, как показано, может регулировать опухолевый рост и инвазию посредством взаимодействия с трансмембранными белками интегринами α 3 β 1, которые, в свою очередь, также были обнаружены в пробах ВКМ, наработанного клетками фибросаркомы HT-1080, и не выявлялись в пробах ВКМ от клеток DF2.

Выводы. Полученные нами данные указывают на то, что ламинин-5 может вносить вклад в индукцию эндотелиально-мезенхимного перехода в клетках эндотелия человека *in vitro* и, вероятно, участвовать в регуляции ангиогенеза при опухолевой инвазии *in vivo*.

МБ33. Создание иммортализованной линии мезенхимальных стромальных клеток эндометрия человека и ее модификация с помощью лентивирусной трансдукции

Т.В. Никитина (nikitinamide@gmail.com)¹, М.Н. Карагяур^{1,2}, А.Р. Раднаева^{1,2}, П.И. Макаревич^{1,2}, Р.Ю. Еремичев^{1,2}

¹Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Мезенхимальные стромальные клетки эндометрия (МСКЭ) человека – важный объект для *in vitro* исследований в физиологии репродукции и в регенеративной медицине. Использование современных подходов с целью получения нокаутов, нокдаунов или гиперэкспрессии генов интереса в данных клетках требует их предварительной иммортализации. Кроме того, для разработки моделей сокультивирования целесообразным является получение линий с

перманентным мечением флуоресцентными белками. Для решения этих задач мы провели работы по трансдукции первичных МСКЭ геном hTERT в целях получения иммортализованной линии МСКЭ, а затем на ее основе получили линии, стабильно экспрессирующие флуоресцентные маркеры - BFP или RFP.

Методы. Первичные МСКЭ выделяли из менструального отделяемого здоровых доноров (n=3) в одной и той же фазе цикла, культивировали до 3-4 пассажа, после чего пулировали. Параллельно проводили трансфекцию линии-продуцента HEK293T смесью плазмид для наработки лентивирусов. Лентивирусы с геном hTERT использовали для трансдукции МСКЭ с селекцией на пурамицине в течение 14 суток. После селекции иммортализованные МСКЭ наращивали в течение 5 пассажей, затем иммунофенотипировали по каноническим маркерам МСК. Полученную линию трансдуцировали лентивирусами с геном BFP или RFP с последующей проточной цитометрией и сортированием клеток.

Результаты. Трансдуцированные hTERT клетки хорошо перенесли воздействие пурамицина, в сравнении с массовой гибелью в контроле. Через 5 пассажей после трансдукции МСКЭ сохраняли фибробластоподобную морфологию, пролиферировали и экспрессировали канонические маркеры МСК (CD73, CD90, CD105). По данным проточной цитометрии эффективность трансдукции иммортализованных МСКЭ генами BFP или RFP составляла около 60 %. Это позволило эффективно сортировать от 30 до 100 тыс. клеток, содержащих целевой трансген. Отсортированные клетки сохраняли морфологию, сигнал флуоресцентного белка, подтверждаемый при помощи прижизненной флуоресцентной микроскопии, и способность к пролиферации в течение не менее 3 пассажей.

Выводы. Нам удалось создать иммортализованную линию МСКЭ человека, полученных от здоровых доноров, при помощи лентивирусной трансдукции геном hTERT. Мы отработали методику трансдукции иммортализованных МСКЭ и достигли стабильной экспрессии в них флуоресцентных белков с сохранением жизнеспособности клеток.

МБ34. Изменение активности генов Tlr4 и IL1 β при воздействии этанола на культуру клеток SH-SY5Y и фармакологическая коррекция рифампицином

Л.И. Орлов (lev.igor.orlov@gmail.com)^{1,2}, Я.А. Христофорова^{3,2}, С.О. Ереско^{2,3}, Д.А. Скабелкин², М.И. Айрапетов^{2,4}

¹Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова, Россия, Санкт-Петербург

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

³Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Россия, Санкт-Петербург

⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Россия, Санкт-Петербург

Введение. Длительное воздействие алкоголя активирует TLR4-сигнальные пути в головном мозге, что служит причиной развития нейровоспаления. Антибиотик рифампицин (Rif) зарекомендовал себя как потенциальный нейропротектор для коррекции патологических механизмов, связанных с нейровоспалением. Цель данной работы заключалась в оценке жизнеспособности клеток нейробластомы SH-

SY5Y и в анализе экспрессии генов Tlr4 и Il1 β при добавлении Rif к культуре клеток до и после воздействия этанола.

Методы. Культивирование клеток SH-SY5Y проводили в среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂ 37 °С. Воздействие алкоголя моделировали путем добавления этанола (100 мМ) в культивируемую среду на 24 ч. Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью AlamarBlue. Rif растворяли в ДМСО и вносили в среду в трех концентрациях (25-100 мМ) за 2 ч до добавления этанола и на 2 ч после. Суммарную РНК выделяли посредством Extract RNA. Обратная транскрипция выполнена с помощью «MMLV RT kit». Реал-тайм ПЦР проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green. Данные были посчитаны методом 2 $\Delta\Delta$ Ct, статистически обработаны.

Результаты. Было выявлено, что длительная инкубация клеток SH-SY5Y в растворе этанола (24 ч, 100 мМ) вызывает активацию генов врожденной иммунной системы Tlr4 и Il1 β . Предварительное добавление Rif (25-100 мМ) до инкубации клеток в растворе этанола ингибирует экспрессию генов Tlr4 и Il1 β , тогда как добавление Rif после инкубации дозозависимо снижает повышенную экспрессию генов Tlr4 и Il1 β , оказывая наиболее значимый эффект в концентрации 100 мМ, и повышает выживаемость клеток.

Выводы. Инкубация клеток SH-SY5Y в растворе этанола вызывает активацию генов Tlr4 и Il1 β . Рифампицин ингибирует данный эффект.

Литература

1. Airapetov, M.I., Eresko, S.O., Lebedev, A.A., Bychkov, E.R., Shabanov, P.D. (2020) The role of toll-like receptors in the neuroimmunology of alcoholism, *Biomeditsinskaya Khimiya*, 66(3), 208-215.

МБ35. Моделирование болезни Гентингтона путем создания изогенных клеточных линий SHSY5Y с индуцибельной экспрессией участка гена HTT, содержащего CAG-повторы разной длины

Ю.А. Островская (ssem357@mail.ru)¹, Л.Д. Беликова¹

¹Лаборатория клеточной биологии ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина, Россия, Москва

Введение. Болезнь Гентингтона (БГ) – это нейродегенеративное заболевание, вызванное селективной гибелью проекционных срединно-шиповых нейронов стриатума. Причиной БГ является экспансия CAG-повторов в первом экзоне гена HTT, что приводит к аномальному удлинению полиглутаминового тракта в белке гентингтине. Гентингтин участвует в транскрипционной регуляции, транспорте веществ, аутофагии и других клеточных процессах. Цель исследования – изучение молекулярных аспектов патогенеза БГ с использованием клеточной модели.

Методы. С помощью лентивирусной трансдукции были созданы изогенные линии нейробластомы человека SHSY5Y с доксициклин-индуцибельной гиперэкспрессией фрагмента гена HTT, содержащего три первых экзона (HTT_{ex1,2,3}). Созданные линии SHSY5Y отличаются по числу CAG-повторов в трансгене HTT_{ex1,2,3} (17 и 108). Для подтверждения функциональности полученной клеточной модели БГ была проведена количественная ОТ-ПЦР, а также выполнено иммуноцитохимическое (ИЦХ) окрашивание с антителами против полноразмерного гентингтина и против

N-концевого фрагмента гентингина, афинными к мутантной форме белка и внутриклеточным агрегатам гентингина. Подобраны олигонуклеотидные LNA-содержащие пробы с последовательностью (C+TG)¹⁰ для изучения локализации мутантной мРНК в ядре методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Результаты. Показано, что при индукции доксициклином экспрессия трансгена НТТех_{1,2,3} возрастает в сотни раз по сравнению с трансгенными клетками SHSY5Y без индукции и исходными клетками SHSY5Y. Проведенное спустя 14 дней после индукции ИЦХ окрашивание трансгенных SHSY5Y демонстрирует накопление агрегатов гентингина, особенно в линии с 108 CAG-повторами в трансгене НТТех_{1,2,3}. Проведены пилотные эксперименты, направленные на подбор оптимальных условий для FISH.

Выводы. На основе линии нейробластомы человека SHSY5Y получена изогенная клеточная модель БГ с индуцибельной гиперэкспрессией участка гена НТТ с разным числом CAG-повторов.

МБ36. Исследование окислительного стресса клеток кожи в условиях 2D И 3D культивирования

Е.Н. Осяева (katya.neiro@gmail.com)^{1,2}, Д.А. Соловьёв^{3,2}, Е.С. Лапина^{3,2}, Э.И. Александер-Синклер²

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

²Институт Цитологии Российской Академии наук, Россия, Санкт-Петербург

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Заживление острых ран кожи предсказуемо по времени и представляет собой динамический процесс, состоящий из четырех перекрывающихся фаз: гемостаз, воспаление, пролиферация и ремоделирование. Однако, под влиянием различных факторов могут произойти нарушения этого процесса, приводящие к его замедлению и переходу острой раны в хроническую. Одной из основных причин такого перехода является продолжительная фаза воспаления, во время которой образуется большое количество воспалительных медиаторов и перекиси водорода (H₂O₂). Избыточное ее накопление вызывает окислительный стресс (ОС), который определяется аккумуляцией активных форм кислорода и снижением антиоксидантной активности клеток, что приводит к повреждению биологических молекул. Проблема устойчивости к ОС клеток кожи, принимающих участие в ранозаживлении, является актуальной. Целью нашей работы было исследование зависимости чувствительности клеток кожи к ОС от удельного количества H₂O₂, плотности клеточного монослоя и времени добавления агента в питательную среду, а также условий культивирования (2D и 3D).

Методы. В качестве тест-систем использовали дермальные фибробласты (ДФ) и разработанный в ИИЦ РАН «Эквивалент дермальный», представляет собой гидрогель на основе коллагена I типа, содержащий ДФ. ОС моделировали действием H₂O₂ в диапазоне концентраций 50–800 мкМ, добавляя ее в питательную среду в пересчете на одну клетку (пмоль/кл.). Влияние ОС на жизнеспособность клеток оценивали путем цитометрического анализа количества клеток, выживших через 24 часа после действия H₂O₂, а также по их морфологии и метаболической активности с использованием методов световой микроскопии и МТТ-теста.

Результаты. При более высокой плотности монослоя большее количество клеток

быстрее утилизирует окислительный агент и менее подвержены ОС, чем клетки, посеянные реже. Добавление H_2O_2 в 2D и 3D условиях к клеткам сразу после их адгезии, оказывает более сильное влияние, чем на уже распластанные клетки.

Выводы. Выявлено, что H_2O_2 в концентрациях 400 – 800 мкМ оказывает на клетки цитотоксическое действие как в 2D и 3D условиях.

МБ37. Особенности транскрипции спермоспецифичной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в меланоме

Е.Р. Петрухин (georgepetruhin@gmail.com)¹, Д.В. Поздышев², А.А. Жарикова¹

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

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Меланома относится к одному из наиболее агрессивных видов злокачественных опухолей. При выявлении метастазов пятилетняя выживаемость пациентов составляет не более 15%. Формирование метастатических клеток из первичной опухоли – сложный, не до конца изученный процесс. Ранее показана важность для метастазирования смены основного источника энергии клеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование. Для клеточных линий меланомы описан феномен эктопической экспрессии гена, кодирующего укороченную форму спермоспецифичного фермента GAPDHS [1]. GAPDHS – это паралог белка глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы – ключевого фермента гликолиза. Конкуренция двух изоферментов за субстрат или белки-партнеры может приводить к изменениям в регуляции гликолиза.

Методы. Качество исходных пар чтений оценено FastQC v0.12.1. Формирование сводных отчетов метрик качества индивидуальных образцов (multiQC v1.17). Парно-концевые прочтения картированы на референсный геном человека (hg38) с помощью hisat2 v2.2.1. Референсная разметка: Ensembl GRCh38.110. На базе референсной разметки собраны все возможные транскрипты для индивидуальных образцов, получены разметки индивидуальные транскриптомов, которые были объединены в итоговую разметку транскриптов для группы образцов (StringTie v2.2.1). По итоговой разметке для каждого образца рассчитан транскрипционный профиль. Для генов GAPDH и GAPDHS проанализированы распределения значений TPM, FPKM и coverage в Python v3.8.5 с помощью библиотек Pandas v1.1.3 и Seaborn v0.11.0. Визуализированы структуры транскриптов и профилей покрытия: IGV v2.16.2, пакет Gviz v1.46.1 в R.

Результаты. Для исследования этого феномена на уровне транскрипции были рассмотрены данные секвенирования РНК 57 образцов первичной меланомы кожи и 23 образцов меланоцитарных невусов с известным клиническим описанием [2]. Было произведено картирование на геном человека hg38, для генов GAPDH и GAPDHS произведен подсчет количества прочтений, а также проанализированы особенности их распределения по последовательности указанных генов. Параллельно с этим были собраны потенциальные транскрипты, было подсчитано количество собранных транскриптов для GAPDH и GAPDHS. Анализ был повторен на данных РНК секвенирования модельных клеточных линий меланомы с известным уровнем накопления белка GAPDHS.

Выводы. Итоговые характеристики (TPM, FPKM и coverage) всех потенциальных

транскриптов говорят в пользу того, что регуляция экспрессии GAPDHS происходит не на уровне транскрипции, а укороченная форма GAPDHS в меланоме – результат альтернативного сплайсинга.

Литература

1. Gill J.G. et al. *Cancer Research* (2022) 82(7):1251-1266

2. Kunz M. et al. *Oncogene* (2018) 37(47):136-151

МБ38. Модифицированные фоторасщепляемые направляющие РНК для создания регулируемой системы CRISPR/Cas9

Л.В. Саковина (kodi99@list.ru)^{1,2}, Е.С. Горленко^{1,2}, Д.О. Жарков^{1,2}, Д.С. Новопашина^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Россия, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

Введение. Целью данной работы является создание фоторегулируемой системы CRISPR/Cas9, обладающей высокой эффективностью и специфичностью. Для этого в состав направляющих РНК вводятся химические модификации и фоточувствительные линкеры, что позволяет повысить устойчивость направляющих РНК к действию нуклеаз, сродство к целевой ДНК-мишени и контролировать функциональную активность CRISPR/Cas9 на уровне направляющей РНК путём УФ-облучения.

Методы. Для получения направляющих РНК (сгРНК и tracrРНК) и модельных ДНК-дуплексов был использован автоматический твердофазный фосфитамидный метод синтеза. Для введения модификаций в сгРНК использовали фосфитамиды 2'-фторсодержащих нуклеотидов и LNA-нуклеотидов, а для введения фотолинкеров синтезирован фосфитамид 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола. Синтезированные РНК выделяли методом препаративного гель-электрофореза. Нарработку плазмидной ДНК и эндонуклеазы Cas9 осуществляли в клетках *E. coli* с очисткой методами адсорбционной/аффинной хроматографии.

Облучение проводили надлиневоыми 365 нм. Разделение продуктов ферментативного гидролиза плазмиды проводили методом электрофореза в агарозном геле, для ДНК-дуплексов – разделение в денатурирующем полиакриламидном геле с визуализацией флуоресценции Су5 в составе одной из цепей ДНК-дуплекса.

Результаты. В ходе исследования процесса фотоиндуцируемого расщепления фотомодифицированных сгРНК, выявлено, что в результате облучения происходит деградация сгРНК. При исследовании расщепления плазмиды нуклеазой Cas9 в присутствии фоторасщепляемых направляющих РНК продемонстрирована возможность инактивации системы путем УФ-облучения. Использование направляющих РНК с двумя фоторасщепляемыми линкерами позволяет более эффективно инактивировать систему.

При расщеплении модельных синтетических ДНК-дуплексов показано, что наличие в структуре сгРНК фоторасщепляемых линкеров увеличивает специфичность расщепления ДНК-мишени нуклеазой Cas9. Использование направляющих сгРНК с одним фотолинкером обеспечивало более высокую специфичность по сравнению с сгРНК с двумя фотолинкерами. При этом максимальную специфичность проявили системы с фоторасщепляемыми сгРНК, не модифицированными по остаткам рибозы.

Выводы. Таким образом, предложенный вариант модифицированных crRНК позволяет повысить устойчивость направляющих РНК к действию нуклеаз и сохранить высокую скорость, эффективность и специфичность расщепления ДНК-мишени эндонуклеазой Cas9, давая дополнительную возможность инактивации системы после облучения УФ-светом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-14-00294

МБ39. Усовершенствованный васкуляризованный дермальный эквивалент, как терапия ран и модель кожи человека

Д. А. Соловьёв (whale203@mail.ru)^{1,2}, Е. С. Лапина^{1,2}, Е. Н. Осяева^{1,3}, Э. И. Александр-Синклер¹

¹*Институт Цитологии Российской Академии наук, Россия, Санкт-Петербург*

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

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

Введение. Ранозаживление – естественная физиологическая реакция на повреждение, в основе которой лежит сложное взаимодействие между различными типами клеток, цитокинами, сосудистой системой и внеклеточным матриксом. Одним из ключевых механизмов заживления ран является ангиогенез: нарушение кровообращения в области повреждения кожи является одной из причин длительного заживления ран. Поэтому изучение механизмов заживления ран является актуальным. Для этого используется множество различных экспериментальных моделей (*in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* и т.д.), которые активно разрабатываются в настоящее время. Целью работы была отработка условий сокультивирования фибробластов кожи и эндотелия сосудов человека с целью получения модельных эквивалентов кожи *in vitro* для изучения ангиогенеза в процессе заживления ран.

Методы. В Институте цитологии РАН проводятся исследования по разработке эквивалентов эпителия кожи человека. Фибробласты и эндотелиальные клетки, выделенные из биоптатов, имеют нормальный фенотип и способны к высокой пролиферации. Из данных культур так же была получена и смешанная, которая изначально представляла из себя 50% DF и 50% HUVEC. Так как исследуемые клетки отличаются сами по себе, то и условия их культивирования различны, потому каждая из культур велась на фибробластной, эндотелиальной и смешанной из двух предыдущих средах.

Результаты. Результаты исследования показали, что разные среды влияют по-разному на данные культуры. Так, например, при сокультивировании на смешанной среде клетки росли по определённой траектории, а не хаотично, помимо этого при создании искусственной раны происходит контракция

Выводы. Из данного эксперимента был получен целый ряд выводов, на которых можно ставить предположения о наиболее подходящих для тех или иных целей условия сокультивирования фибробластов и эндотелиальных клеток человека. К тому же, это позволило приблизиться к созданию васкуляризованного дермального эквивалента.

МБ40. Омиксные подходы к изучению молекулярных особенностей ферроптоза

В.К. Сулягин (*sulyaginvk@gmail.com*)¹, В.С. Ледеява¹, О.М. Кудряшова², А.Г. Шохина^{1,2}

¹Лаборатория экспериментальной онкологии НИИ трансляционной медицины

РНИМУ им. Н.И.Пирогова, Москва

²Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва

Введение. Ферроптоз – тип неапоптотической программируемой клеточной гибели, отличительными чертами которой являются перекисное окисление липидов и накопление железа в клетке. Омиксные подходы позволяют детектировать отличия в экспрессии генов при индукции ферроптоза и формулировать гипотезы о вкладе компартментов клетки в данный процесс. Для обогащения белковой фракции исследуемого компартмента используют метод Proximity labeling с рекомбинантной аскорбатпероксидазой APEX2.

Методы. Мы индуцировали ферроптоз в клетках Pfa1 химическими индукторами (эрастин, ML210, L-бутионинсульфоксимин), а также генетически – тамоксифеном, который опосредовал нокаут глутатионпероксидазы 4 (GPX4), ключевого антиферроптотического белка. Проточной цитометрией продемонстрировано накопление окисленных форм липидов в клетках с индуцированным ферроптозом. Для анализа дифференциальной экспрессии генов при индукции ферроптоза использовались методы транскриптомики и протеомики. Для изучения изменений в белковом составе компартментов клетки методом Proximity labeling при помощи липофильной трансфекции и лентивирусной трансдукции были созданы моноклональные линии Pfa1, экспрессирующие APEX2, локализованную в требуемом компартменте. Валидацию локализации и функциональной активности APEX2 осуществляли методами иммуноцитохимического окрашивания и Вестерн-блот.

Результаты. При индукции ферроптоза тамоксифеном, или ML210, наблюдается увеличение активности транскрипционных факторов SREBF, являющихся регуляторами мевалонатного пути и синтеза жирных кислот. Индукция ферроптоза эрастином вызывает увеличение активности фактора Atf4, связанного с ответом клетки на стресс при недостатке аминокислот, а также фактора PGC1-альфа, важного регулятора экспрессии различных митохондриальных белков. Получены моноклональные линии клеток Pfa1, экспрессирующие APEX2 на внутренней мембране митохондрий, ЭПР и аппарата Гольджи (АГ), для дальнейшего анализа вклада данных компартментов в процесс инициации ферроптоза.

Выводы. Первичный анализ протеомических и транскриптомных данных показал статистически значимые изменения экспрессии определённых генов.

Получены клеточные линии с валидированной функциональной активностью APEX2, что позволит провести анализ изменения протеомического профиля таких клеточных компартментов как митохондрии, ЭПР и АГ в условиях индукции ферроптоза.

МБ41. Сравнительная эффективность методов диагностики мутаций гена KRAS при колоректальном раке

Я.В. Тарасов (tarasov_yar@inbox.ru)¹, Г.В. Гудков², М.Л. Золотавина¹, Т.В. Федоренко²

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Россия, Краснодар

²ГБУЗ «Детская городская больница г. Краснодар», Россия, Краснодар

Введение. По данным литературы доля активирующих мутаций в гене KRAS при колоректальном раке (КР) составляет 30 – 40%, что имеет решающее значение при проведении анти-EGFR таргетной терапии. Наиболее распространенные активирующие мутации локализованы в 12 и 13 кодонах.

Цель состоит в сопоставлении чувствительности методов ПЦР в реальном времени (РТ-ПЦР) и капельно-цифровой ПЦР (КЦ-ПЦР) в диагностике мутаций гена KRAS при КР относительно метода секвенирования по Сенгеру.

Методы. Материал исследования: образцы ДНК, выделенной из парафиновых срезов 150 пациентов с подтвержденной аденокарциномой разных отделов кишечника. РТ-ПЦР выполняли на приборе CFX-96, Bio-Rad, США (реагенты Real-Time-PCR-KRAS-7M, Россия, «Биолинк»); КЦ-ПЦР – на QX200 Droplet Digital PCR, Bio-Rad, США (реагенты ddPCR™ KRAS Screening Multiplex, BioRad, США); секвенирование – на Applied Biosystems 3500 xL, Thermo Fisher Scientific, США (реагенты BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты. В результате исследования методом секвенирования мутации гена KRAS (G12D, G12V, G13D, G12A, G12C, G12R, G12S) были обнаружены в 42,4% (n=63). При использовании РТ-ПЦР мутации аналогичного спектра были выявлены в 45% (n=68), а при использовании КЦ-ПЦР – в 36,4% (n=55). В структуре мутаций доминировали G12D (33,3%) и G13D (25,4%). Доля остальных составила: G12V – 20,7%, G12S – 15,8% и G12C – 4,8%. Мутации G12R и G12A выявлены не были.

В пяти образцах мутации, обнаруженные РТ-ПЦР не были подтверждены методом секвенирования, а КЦ-ПЦР метод не выявил мутации в восьми образцах, обнаруженных секвенированием. Сравнительный статистический анализ чувствительности РТ-ПЦР и КЦ-ПЦР относительно секвенирования показал максимальную специфичность метода КЦ-ПЦР (100% против 94,4% РТ-ПЦР), но меньшую чувствительность (85,7% против 87,5% РТ-ПЦР).

Выводы. Таким образом, для более надежной верификации мутаций гена KRAS необходима комбинация методов РТ-ПЦР и КЦ-ПЦР.

МБ42. Характер влияния малой некодирующей 6S-1 РНК на синтез сурфактина в клетках *Bacillus Subtilis*

В.С. Трефилов (*trefilov.vadik@gmail.com*)¹, Е.Ю. Линдин¹, О.Ю. Буренина², Е.А. Кубарева³

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

²Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия

Введение. Сурфактин – циклический липопептид, состоящий из гептапептидного кольцевого фрагмента и остатка жирной кислоты (C14-C15). Он является одним из самых изученных биосурфактантов и обладает высоким потенциалом практического применения в косметической и пищевой промышленности, нефтепереработке, а также фармакологии. Из-за сложности структуры его химический синтез нерентабелен, единственным путем промышленного получения является микробиологический синтез. Однако стоимость получаемого вещества ввиду низкой эффективности биосинтеза естественными продуцентами слишком велика. Разработка штаммов-суперпродуцентов сурфактина позволит решить эту проблему и повысить его доступность для различных сфер применения. Цель работы – оценка влияния нокаута гена малой некодирующей 6S-1 РНК, являющейся глобальным регулятором транскрипции генов в бактериальной клетке, на биосинтез сурфактина клетками *B. subtilis*. В работе использовали два штамма данной бактерии – лабораторный PY79 и дикий NCIB 3610.

Методы. Относительное количество мРНК генов, кодирующих субъединицы сурфактин-синтегазы и регуляторы биосинтеза сурфактина, определяли методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Для оценки эффективности биосинтеза сурфактина в бактериальных клетках были выбраны и оптимизированы 2 метода: спектрофотометрический метод, основанный на разрушении комплекса между рН-индикатором бромтимоловым синим и катионным ПАВ хлоридом цетилпиридиния при добавлении к нему раствора сурфактина, и обращено-фазовая ВЭЖХ.

Результаты. Для штаммов PY79 и NCIB 3610 в отсутствие 6S-1 РНК наблюдалось повышение уровня мРНК всех генов оперона *sgfA*, кодирующего сурфактин-синтегазу, в поздней стационарной фазе роста. Также были оптимизированы методики полуколичественного и количественного определения сурфактина с помощью рН-зависимого индикатора бромтимолового синего и обращено-фазовой ВЭЖХ соответственно. С их использованием показано, что нокаут гена 6S-1 РНК, несмотря на активацию транскрипции генов сурфактин-синтегазы, не приводит к увеличению количества продуцируемого клетками сурфактина.

Выводы. Таким образом, несмотря на увеличение уровня транскрипции оперона *sgfA*, кодирующего сурфактин-синтегазу, делеция гена 6S-1 РНК не способствует повышению эффективности биосинтеза сурфактина в клетках бактерий *B. subtilis* PY79 и NCIB3610. Данный факт требует дополнительного изучения и будет исследован нами в дальнейшем.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда научных исследований № 24-24-00193.

МБ43. Сравнение систем и условий получения псевдовиральных частиц хантавирусов

В.О. Труфанов (trufanov8@mail.ru)¹, А.А. Исаева¹, Д.Н. Щербаков¹

¹ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п.Кольцово, Россия

Введение. Хантавирусы являются возбудителями ряда лихорадочных и геморрагических заболеваний. Количество летальных исходов ежегодно достигает 200000 [1], вместе с этим увеличивается и заражаемость хантавирусами – это обуславливает потребность разработки вакцин и терапевтических препаратов.

Псевдотипированные вирусы - рекомбинантные частицы из репликационно-дефектного капсида и поверхностных белков целевого вируса. Они не содержат генетического материала - работа с ними безопасна [2], а поверхностный белок целевого вируса позволяет исследовать его взаимодействие с клеточными рецепторами.

Цель работы - получить частицы, псевдотипированные белком вируса Хантаан, с использованием рабдо- и лентивирусной платформ [3], оценить трансдуцирующую активность частиц и провести сравнение этих систем.

Методы. Контрукция рСAG-Nan получена клонированием гена поверхностного гликопротеина вируса Хантаана в составе экспрессионного вектора рСAG. Корректность сборки вектора рСAG-Nan проверена секвенированием по Сенгеру.

При использовании рабдовирусной платформы культура клеток НЕК293 обрабатывалась плазмидой рСAG-Nan с внесением коровых частиц рекомбинантного вируса везикулярного стоматита. В случае использования лентивирусной системы проводилась котрансфекция НЕК293 плазмидой рСAG-Nan, оболочечной плазмидой рsPAX2 и репортерной плазмидой рLV.

Функциональный анализ проведен с использованием клеток НЕК293. К их культуре добавляли полученные псевдовirusы с последующим лизированием и внесением люциферина. Выводы о трансдуцирующей активности делали на основании уровня люминесценции.

Результаты. Псевдовirusы, полученные на рабдовирусной системе, демонстрировали меньшую функциональную и трансдуцирующую активность в сравнении с полученными на лентивирусной системе.

Выводы. С учетом меньшей токсичности и лучших результатов функционального анализа, лентивирусная система была выбрана для дальнейшей наработки псевдовirusов. Для оптимизации процесса и увеличения выхода псевдовirusов планируется варьирование условий трансфекции и конфентрирования

Литература

1. Duehr J. et al. Neutralizing monoclonal antibodies against the Gn and the Gc of the Andes virus glycoprotein spike complex protect from virus challenge in a preclinical hamster model // MBio. – 2020. – Т. 11. – №. 2. – С. 10.1128/mbio.00028-20.
2. Zhang L. et al. A bioluminescent imaging mouse model for Marburg virus based on a pseudovirus system // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2017. – Т. 13. – №. 8. – С. 1811-1817.
3. Xiang Q. et al. Application of pseudovirus system in the development of vaccine, antiviral-drugs, and neutralizing antibodies // Microbiological Research. – 2022. – Т. 258. – С. 126993.

МБ44. Транскриптомное профилирование автономных морфогенетических свойств мезенхимальных стромальных клеток кожи и эндометрия человека

М.М. Хандохин (*m_khandokhin@inbox.ru*)², П.И. Макаревич^{2,3}, Р.Ю. Еремичев^{2,3}

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

²Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Одной из находок в процессе изучения терапевтических свойств мезенхимальных стромальных клеток (МСК) является различие физиологических эффектов клеток из разных тканевых источников. Это нашло свое отражение в рекомендациях Международного общества по клеточной и генной терапии от 2019 года [1] в виде необходимости указывать происхождение МСК, используемых в работе. Логичным следствием из обнаруживаемых феноменов является предположение, что МСК обладают устойчивыми внутренними (автономными) тканеспецифичными свойствами, в какой-то степени сохраняющимися *in vitro*. Однако конкретные различия отмечаемых эффектов могут быть обусловлены как разной адаптацией МСК к условиям *in vitro* культуры, так и сохранением существовавших *in vivo* свойств. Целью данной работы было оценить вклад каждого из этих компонентов с помощью транскриптомного анализа собственных и опубликованных данных РНК-секвенирования.

Методы. На 3-4 пассаже брали по 3 первичных линии МСК эндометрия и МСК кожи, полученные от разных доноров, выделяли РНК и проводили РНК-секвенирование. На основе полученных результатов с помощью пакетов R DESeq2 и edgeR мы получали список дифференциально экспрессирующихся (ДЭ) генов. Из опубликованных в Human Protein Atlas данных получали гены, отличающиеся минимум в 4 раза по экспрессии между стромальными клетками того же происхождения *in vivo*. Далее пересекающиеся и отличающиеся между этими множествами гены аннотировали по Gene Ontology (GO).

Результаты. После анализа пакетами DESeq2 и edgeR мы выявили 1392 и 1410 ДЭ генов, соответственно, общих оказалось 1206. Из них для дальнейшего анализа были выделены только кодирующие белки гены (994 гена). По данным Human Protein Atlas, генов, отличающихся по экспрессии между теми же типами клеток *in vivo*, оказалось 2861. Из 994 выявленных нами ДЭ генов *in vitro*, 326 входят в отличающиеся *in vivo* гены, а 668 не входят. После аннотации генов с помощью Gene Ontology оказалось, что среди обоих этих наборов преобладают термины, относящиеся к эмбриональному развитию и морфогенезу.

Выводы. МСК различного происхождения обладают автономными тканеспецифичными свойствами, связанными с механизмами морфогенеза. Тканеспецифичные свойства МСК должны быть важны для реализации функции органов, содержащих данные клетки. Отчасти данные свойства изменяются в ходе адаптации клеток к условиям *in vitro*, но вместе с тем сохраняется дифференциальная экспрессия крупного ($n=326$) пула генов, выявляемая *in vivo*. Наши результаты указывают на возможность обоснованного изучения свойств, контролируемых этими генами, в *in vitro* моделях.

Литература

1. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I, Nolta J, Phinney DG, Sensebe L. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*. 2019 Oct;21(10):1019-1024. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.08.002.

МБ45. Поиск потенциальных генов-мишеней для новых подходов в терапии глиобластом с помощью РНК-интерференции

А.В. Циммерман (anita2420910@icloud.com)¹, М. Ю. Кордюкова², М. А. Сорокина³, Д.Ю. Травникова³, Т. О. Абакумова³

¹Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства России, Россия, Москва

³ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия, Москва

Введение. Глиобластома – злокачественная опухоль головного мозга, которая остается одним из самых смертоносных видов рака с медианой выживаемости менее 2 лет. В настоящее время стандартом лечения для глиобластом является хирургическая резекция с последующей лучевой терапией и химиотерапией. Причиной рецидивов и осложнений нередко служит химиорезистентность опухоли, которая часто связана с глиомными стволовыми клетками.

В данной работе нами были подобраны молекулярные мишени, ассоциированные с различными функциями опухолевых клеток (пролиферация, инвазия, миграция, поддержание гомеостаза), среди которых особый интерес представляют эпигенетические модуляторы – в частности, метилтрансфераза EZH2, деметилаза LSD1 и белки BET-семейства: BRD4 и BRD2.

Методы. Был проведен анализ транскриптома первичных культур СКГ, далее для подтверждения полученных данных был оценен уровень экспрессии EZH2 в линиях СКГ по сравнению с контролем (астроцитами, фибробластами) методом ПЦР в реальном времени (rt-PCR). Для ингибирования синтеза таргетной мРНК был осуществлен дизайн и синтез малых интерферирующих РНК (миРНК) к EZH2, проведена трансфекция клеток глиомы с помощью липофектамина. Эффективность ингибирования была оценена с помощью метода rt-PCR с выбранными праймерами к EZH2

Результаты. На основе данных транскриптома различных клеточных линий первичных культур были выбраны линии пациентов с повышенной экспрессией генов-мишеней. С помощью метода rt-PCR было показано, что уровень мРНК EZH2 в выбранных линиях в 7-20 раз больше по сравнению с контролем (фибробласты, астроциты человека). Для ингибирования данной мишени был проведен дизайн и синтез различных миРНК. На клеточной линии глиомы U87 было показано, что инкубация клеток глиобластомы с выбранными миРНК в течение 72 часов позволяет эффективно снизить уровень мРНК EZH2 по сравнению с контролем.

Выводы. Полученные данные позволяют рассматривать EZH2 в качестве перспективной мишени для терапии. Таким образом, ингибиторы EZH2 и других онкогенных модуляторов хроматина имеют большой потенциал при использовании

в сочетании с ингибиторами тирозиновых сигнальных киназ (входят в состав различных клеточных путей, выступая в качестве регуляторов высшего порядка) и могут служить основой для создания новых схем комбинированной терапии глиобластомы.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФ 22-75-10151.

МБ46. Анализ экспрессии гена *FLNC* в клеточной модели *FLNC* ассоциированной рестриктивной кардиомиопатии

М.Ю. Шарикова (*sharikova.marg@yandex.ru*)¹, Д.В. Голицова^{1,2}, О.С. Лебедева^{1,3}, А.Н. Богомазова^{1,3}

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Россия, Москва

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, Москва

³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина, Россия, Москва

Введение. Рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) – это орфанная патология миокарда, характеризующаяся ригидностью стенок желудочков и диастолической дисфункцией. РКМП часто связана с мутациями генов, кодирующих белки цитоскелета или саркомеров. Одним из генов, ассоциированных с РКМП, является ген гомодимерного актин-связывающего белка филамина С – *FLNC*.

Удобной моделью для изучения патогенеза РКМП являются кардиомиоциты, получаемые *in vitro* путём направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). В нашей лаборатории ранее получены линии ИПСК *ips-fil14*, *ips-fil23* и *ips-fil24* из фибробластов пациента с гетерозиготной мутацией с.7416_7418delGAA в гене *FLNC* и диагнозом РКМП. В кардиомиоцитах данного пациента предполагается компенсаторное повышение экспрессии аллеля дикого типа гена *FLNC* для восполнения недостатка мономеров белка нормального строения.

Целью настоящего исследования являлась оценка соотношения экспрессии аллеля дикого типа и мутантного аллеля (*wt/mut*) гена *FLNC* в кардиомиоцитах и других пациент-специфичных производных ИПСК.

Методы. Кардиомиоциты, нейральные клетки-предшественники, клетки дефинитивной энтодермы и фибробластоподобные производные были получены из ИПСК пациента по ранее отработанному в лаборатории протоколу. Основным методом оценки соотношения *wt/mut* служила количественная ОТ-ПЦР с использованием аллель-специфичных зондов типа TaqMan.

Результаты. Анализ соотношения экспрессии аллелей *wt/mut* гена *FLNC* в ИПСК линий *ips-fil14*, *ips-fil23* и *ips-fil24*, а также в полученных из них кардиомиоцитах, нейральных клетках-предшественниках, клетках дефинитивной энтодермы и фибробластоподобных производных опроверг первоначальную гипотезу о тканеспецифичной повышенной экспрессии аллеля дикого типа гена *FLNC*. В дальнейшем нами планируется проведение аналогичных исследований на независимо полученной в США линии ИПСК того же пациента.

Выводы. В полученной нами клеточной модели РКМП в кардиомиоцитах пациента не наблюдается значительного сдвига экспрессии гена *FLNC* в сторону какого-либо из аллелей: мутантного или дикого типа.

Работа выполнена за счет гранта РФФ № 23-25-00456.

МБ47. Функционирование ГАМК-трансаминазы в листьях *Zea mays L.* при засолении

З.Н. Шахов (zakharshakhov@gmail.com)¹, Г.Б. Анохина¹, А.Т. Епринцев¹

¹Медико-биологический факультет ВГУ, Россия, Воронеж

Введение. ГАМК-шунт – адаптационный анаплеротический путь, активирующийся при солевом стрессе, в который входит ГАМК-трансаминаза (ГАМКТ, КФ 2.6.1.19). В настоящее время имеются сведения о роли ГАМК как фитомедиатора, ГАМК участвует в передаче стрессового сигнала за счёт наличия на митохондриальной мембране специфических рецепторов [1, 2]. Однако, мало сведений, посвященных изучению функционирования катаболизма ГАМК в условиях солевого стресса. Более того, до сих пор не установлен механизм регуляции функционирования ферментов, метаболизирующих ГАМК.

Методы. Измерение активности ГАМК-Т. Активность ГАМК-Т определяли спектрофотометрическим методом. Среда спектрофотометрирования содержала 0.1 мкМ пиридоксаль-5-фосфата, 5 мМ 2-оксоглутарата, 200 мкл фракции митохондрий из кукурузы, 4 мМ НАД⁺, Tris-HCl буфер (рН 8.5).

Real-time ПЦР. Полученную в ходе ПЦР с обратной транскрипцией кДНК использовали для проведения ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами на приборе LightCycler96 («Roche», Швеция) с применением Taq-полимеразы (ЗАО «Евроген») согласно рекомендациям производителя.

Результаты. С первых часов инкубации наблюдали повышение ферментативной активности ГАМК-Т, к 24 часам наблюдали максимальную активность. С первых часов эксперимента уровень транскриптов гена *GTA-1* возрастал более чем в 9 раз, однако дальнейшая инкубация привела к инаktivации экспрессии гена. Ген *GTA-2* с первых часов эксперимента был ингибирован, однако с 6 по 24 часы наблюдалась повышенная экспрессия относительно контроля.

Выводы. Выяснено, что при солевом стрессе происходит повышение ферментативной активности ГАМК-трансаминазы, свидетельствующее об активации ГАМК-шунта. При этом, гены *ГАМК-Т*, *GTA-1* и *GTA-2* экспрессируются в различные часы инкубации, вероятно, *GTA-2* играет роль в адаптации к солевому стрессу, поддерживая ЦТК, тогда как *GTA-1* сопряжен с обратной реакцией для накопления пула ГАМК, выполняющей роль фитомедиатора.

Литература

1. Seifkhalhor M. et al. (2019). Diverse role of γ -aminobutyric acid in dynamic plant cell responses // Plant Cell Rep. 38, 847-867.
2. Ramesh S. A. et al. (2017). γ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in plants // CMLS. 74, 1577-1603.

МБ48. Получение фибробластоподобных производных ИПСК с нокаутом генов, кодирующих основные активирующие НК-клеточные лиганды

Д.К. Шерман (dar.sher.man0@gmail.com)^{1,2}, М.Е. Богомякова²

¹*Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

²*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю. М. Лопухина, ФМБА, Россия, Москва*

Введение. Персонализированная терапия на основе ИПСК должна позволить избежать применения иммуносупрессивной терапии. Однако остаются сомнения в толерантности иммунной системы в отношении пациент-специфичных производных ИПСК. Ранее в нашей лаборатории были получены сведения о чувствительности фибробластоподобных производных ИПСК (iPS-fibro) к цитотоксическим свойствам аутологичных НК-клеток. Было показано, что ответ НК-клеток обусловлен нарушением баланса активирующих и ингибирующих лигандов на поверхности iPS-fibro [1]. Однако вклад отдельных лигандов в НКклеточный ответ против iPS-fibro остается неизвестным. Данная работа посвящена созданию iPS-fibro с нокаутом генов активирующих лигандов NECTIN2, PVR, MICA для дальнейшего определения наиболее значимого из них.

Методы. Последовательность gRNA подбирали с помощью онлайн-ресурса CRISPOR. Генно-инженерные конструкторы для экспрессии sgRNA и нуклеазы Cas9 собирали на основе плазмиды PX458. Направленную дифференцировку ИПСК в iPS-fibro проводили по ранее отработанному протоколу [1] через стадию эмбрионидных телец. Нокаутные клетки отбирали при помощи клеточного сортера BD FACSMelody™.

Результаты. Для каждого из генов интереса были получены по три генно-инженерных конструктора с различными gRNA. Эффективность редактирования клеточной линии HEK293 для самой эффективной gRNA составила: 78% для NECTIN2, 83% для PVR, 90% для MICA. Полученные в ходе направленной дифференцировки iPS-fibro были охарактеризованы с помощью проточной цитометрии по уровню экспрессии маркеров фибробластов: CD44, CD73 и CD90. Было показано, что электропорация iPS-fibro более эффективна, чем трансфекция различными коммерческими липофектантами. Через 8–10 дней после трансфекции путем сортировки негативной популяции были получены iPS-fibro с нокаутом NECTIN2, PVR и MICA.

Выводы. В ходе данной работы было создано по три генно-инженерных конструктора для нокаута генов NECTIN2, PVR и MICA, и выбраны наиболее эффективные из них. ИПСК двух здоровых доноров были дифференцированы в iPS-fibro, которые имели характерную морфологию и экспрессировали основные маркеры фибробластов. Были подобраны оптимальные условия для трансфекции iPS-fibro, и получены клетки, нокаутные по генам NECTIN2, PVR, MICA.

Работа поддержана грантом РФФ №22–15–00250.

Литература

1. Bogomiakova M.E., Sekretova E.K., Anufrieva K.S., Khabarova P.O., Kazakova A.N., Bobrovsky P.A., Grigoryeva T.V., Ereemeev A.V., Lebedeva O.S., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. (2023) iPSC-derived cells lack immune tolerance to autologous NK-cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors, Stem Cell Res Ther 14, 77

МБ49. Анализ взаимодействия FXR1 с белками стресс-гранул в дрожжевой модельной системе

А.К. Юзман (*nastyu.yuzman.00@gmail.com*)¹, Т.А. Белашиова^{2,1}, А.А. Валина^{1,2}, А.П. Галкин^{1,2}

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

²Санкт-Петербургский филиал ИОГен РАН им. Н.И. Вавилова, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Стресс-гранулы — это немембранные комплексы белков и РНК, которые образуются в цитоплазме клетки при воздействии стрессовых факторов. К коровым компонентам стресс-гранул, примерами которых являются белки TIA-1 и FMRP [1], присоединяются десятки разных белков. Состав стрессгранул различается при разных патологиях. Так, при наследственной ранней форме болезни Альцгеймера в состав нейрональных стресс-гранул включается белок SFPQ [2]. Известно, что FMRP у млекопитающих имеет несколько гомологов, среди которых функциональный амилоид FXR1 [2]. Ранее мы показали, что FXR1 демонстрирует частичную колокализацию с FMRP в кортикальных нейронах мозга крысы *R. norvegicus* и в культуре клеток нейробластомы человека IMR-32 в условиях стресса. Целью данной работы является анализ возможного взаимодействия FXR1 с белками стресс-гранул TIA-1 и SFPQ в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*.

Методы. Для оценки взаимодействия FXR1 с TIA-1 и SFPQ были сконструированы плазмиды, кодирующие химерные белки, содержащие последовательности FXR1, TIA-1 и SFPQ, слитые с репортной последовательностью флуоресцентных белков. В качестве негативного контроля оценивалась также колокализация FXR1-YFP с химерным белком PrP-CFP. Белок PrP млекопитающих способен агрегировать, но не входит в состав стресс-гранул. Был проведён попарный анализ колокализации белка FXR1-YFP с белками SFPQ-CFP, TIA-1CFP, а также PrP-CFP.

Результаты. Мы показали, что частота колокализации FXR1 с коровым компонентом стресс-гранул TIA-1 составила 80%, тогда как с белком SFPQ она составила 45%. В контрольном эксперименте частота колокализации FXR1 с PrP не превышала 20%.

Выводы. Высокие частоты колокализации FXR1 с коровым компонентом стрессгранул TIA-1 позволяют полагать, что эти белки физически взаимодействуют, и FXR1 может включаться в состав стресс-гранул.

Литература

1. Marcelo A., Koppenol R., Almeida L., Carlos A. Matos, and No'brega C. (2021) Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases: too much aggregation? *Cell Death Dis.*, 148, 12(6):592.
2. Younas N., Zafar S., Shafiq M., Noor A., Siegert A., Arora A., Galkin A., Zafar A., Schmitz M., Stadelmann C., Andreoletti O., Ferrer I., Zerr I. (2020) SFPQ and Tau: critical factors contributing to rapid progression of Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol.*, 140(3):317-339.

МБ50. Репортерные конструкции для оценки формирования Квадруплексных структур *in vivo*

Ю.В. Якушкина (dddd80486@gmail.com)¹, М.В. Монахова²

¹Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. G-квадруплексы (G4) играют важную роль в регуляции биологически значимых процессов. Известно, что промоторная область гена, кодирующего каталитическую субъединицу теломеразы человека (hTERT) формирует три тандемных параллельных G4. В месте его центрального G4 встречаются мутации, приводящие к развитию онкологических заболеваний (C228T и C250T). Показано, что белок системы репарации «мисматчей» MutS эффективно взаимодействует с G4 *in vitro* и, предположительно, может стабилизировать G4 *in vivo*. Таким образом, целью исследования являлась разработка репортерной системы, позволяющей оценить возможность формирования G4 и влияние MutS на их стабильность в клеточных условиях.

Методы. Методами молекулярного клонирования получены плазмидные ДНК, содержащие область промотора гена hTERT нативного строения или с «драйверными» заменами в G4 и гены двух флуоресцентных белков — Cerulean и RFP. По изменению сигнала Cerulean/RFP клеток *E. coli* оценивали формирование G4 и их стабильность при введении нуклеотидных замен. Для оценки влияния MutS на стабильность G4 использовался штамм *E. coli* с делецией гена *mutS*, в который вместе с репортерной конструкцией вводили плазмиду с геном *mutS* под контролем *lac*-оперона. Влияние MutS на стабильность G4 оценивали, измеряя флуоресценцию таких клеток в присутствии индуктора.

Результаты. Впервые получены репортерные плазмиды, содержащие часть промоторной области hTERT различного строения (pWT, pC228T, pC250T, pC228+250T). Величина относительной флуоресценции *E. coli* увеличивается в ряду pWT < pC228T < pC250T < pC228+250T, что согласуется со способностью последовательностей вставки формировать G4, продемонстрированные ранее *in vitro*. Также показано, что несмотря на высокое сродство MutS к G4 *in vitro*, в условиях *in vivo* влияние белка на стабильность G4 не обнаружено.

Выводы. Разработана репортерная система на основе флуоресцентных белков Cerulean и RFP, позволяющая оценивать стабильность G4 *in vivo*. С помощью полученных репортерных систем показано образование G4 в промоторе hTERT, изучено влияние нуклеотидных замен и белка MutS на стабильность G4.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 21-14-00161.

МБ51. Разработка метода детекции трехмерных контактов плазмидной ДНК с хроматином в клетках HEK293T

А.П Ян (a.yan@g.nsu.ru)^{1,2}, П.А Сальников^{1,2}, В.С Фишман^{1,2}

¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Хроматин в интерфазном ядре позвоночных характеризуется сложной пространственной организацией, которая опосредована двумя механизмами. Первый реализуется за счет взаимодействия белкового комплекса когезина с ДНК, модулируемого белком CTCF, что приводит к образованию хроматиновых петель и доменов. Второй - механизм фазовой сепарации, в результате которого посредством связывания ДНК и белков и взаимодействий между последними формируются функциональные компартменты ядра [1]. Хотя структура нативного хроматина позвоночных широко изучена, вопрос о пространственной организации экзогенных последовательностей, таких как вирусная и плазмидная ДНК, внутри ядра остается дискуссионным.

Методы. Мы предлагаем метод, основанный на 4С-эксперименте, для детекции пространственных контактов плазмидной ДНК с хроматином клеток человека. Для этого трансфицируем клетки человека HEK293T плазмидным вектором, получаем и секвенируем 4С-библиотеки

Результаты. Мы спроектировали специально адаптированный для 4С-эксперимента плазмидный вектор, применение которого, позволяет детектировать контакты плазмиды с ДНК человека с эффективностью свыше 85%.

Выводы. Таким образом, впервые показана возможность применения 4С-метода для изучения контактов плазмидной ДНК с хроматином в ядре клетки. Этот результат открывает перспективы использования метода 4С с плазмидой для исследования того, как различные последовательности ДНК, встроенные в плазмиду (активные и неактивные участки генома, сайты связывания белков группы Polysomb и др.), будут влиять на локализацию плазмиды внутри ядра.

Авторы выражают благодарность М.М Гридиной и

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-14-00247

Литература

1. Hildebrand, E.M., Dekker J. (2020) Mechanisms and Functions of Chromosome Compartmentalization, Trends Biochem. Sci., 45, 385–396.

МБ52. Роль стохастических процессов в колебаниях концентрации кальция в тромбоцитах

Е.А. Молоткова (molotkova.ea19@physics.msu.ru)¹, Ф.А. Балабин², Ф.И. Атауллаханов²

¹Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Москва, Россия

Введение. Тромбоцит – безъядерная клетка крови, способная активироваться. Активация тромбоцитов играет ключевую роль в остановке артериальных кровотоков и тромбообразовании. В процессе активации кальций выступает универсальным вторичным посредником, его концентрация может увеличиваться на три порядка и резко изменяться, образуя характерные осцилляции. Реакции тромбоцита на внешние стимулы очень разнообразны, поэтому можно предположить, что осцилляции концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]$) в клетке “кодируют” характер клеточного ответа. Декодирование колебаний $[Ca^{2+}]$ затруднено тем, что в них присутствует явная стохастическая составляющая. Стохастичность осцилляций неизбежна, так как тромбоцит – клетка малого размера, порядка микрометра, поэтому в его цитозоле может быть всего несколько десятков свободных ионов кальция при характерной концентрации в 10 нМ [1]. Существуют различные детерминированные модели, в которых осцилляции $[Ca^{2+}]$ генерируются предельным циклом. Такие модели не способны воссоздать разнообразие картин осцилляций, характерных для тромбоцитов, поэтому необходимо построение стохастических моделей.

Методы. Целью настоящей работы является определения механизмов влияния стохастичности, на осцилляции $[Ca^{2+}]$. Исследование проводится с помощью стохастического моделирования методом Гиллеспи и сравнения с экспериментальными данными [2].

Результаты. Анализ поведения стохастической модели показал, что в системе может наблюдаться иной механизм генерации импульсов, отличный от предельного цикла, описывающий экспериментальные данные. Возможен особый “ждущий режим”, реализующий вместо периодических колебаний одиночные импульсы. Результаты работы говорят о том, что, по-видимому, в тромбоците возникновение осцилляций $[Ca^{2+}]$ происходит вне предельного цикла.

Литература

1. Шахиджанов С. С. и др. Кальциевые осцилляции в тромбоцитах крови и их возможная роль в «интерпретации» клеткой информации из внешнего мира // Успехи физических наук. – 2019. – Т. 189. – No. 7. – С. 703-719.
2. Shepeliuk T.O., Masaltseva A.A., Nechipurenko D.Y., Ataulakhanov F.I., Grishchuk E.L. Dense Granules Are Released Cooperatively in Activated Platelets [abstract] // Res Pract Thromb Haemost. 2021; 5 (Suppl 2).

МБ53. Влияние поли(АДФ-рибоза)полимераза-1 на взаимодействие dCas-белков с нуклеосомами

А.С. Назарова (nazarova.al000@gmail.com)¹

¹*Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Геном эукариот упакован в высокоорганизованный нуклеопротеиновый комплекс — хроматин, структурной единицей которого является нуклеосома. Поли(АДФ-рибоза)полимераза-1 (PARP1), один из самых распространенных белков нуклеоплазмы, участвует во многих ядерных процессах. Взаимодействие с PARP1 вызывает реорганизацию структуры нуклеосомы. Неактивные нуклеазы dCas исследуются как компоненты систем направленного перепрограммирования активности генов, а механизмы их взаимодействия и ограничения в системе эукариотического генома требуют детального изучения. В данной работе исследовано влияние PARP1 на взаимодействие неактивных нуклеаз dSpCas9 и dFnCas12a с целевой последовательностью ДНК (цДНК), расположенной в разных областях нуклеосомы.

Методы. Флуоресцентно меченую ДНК матрицу совместно с комплексом гистонов *Homo sapiens* использовали для сборки нуклеосом методом ступенчатого диализа в буферах с понижающейся ионной силой. Нуклеосомы были охарактеризованы методом гель-электрофореза в нативных условиях. Сформированные комплексы нуклеосом с PARP1 инкубировали с гРНК/dCas и изучали методом нативного электрофореза в геле. Подвижность комплексов в геле анализировали по флуоресценции нуклеосом.

Результаты. Установлено, что взаимодействие dCas9 с цДНК, расположенной в области диадной оси нуклеосомы, затруднено. Показано, что образование комплекса PARP1 с нуклеосомой облегчает связывание dCas9 в этой области, по-видимому, благодаря реорганизации структуры нуклеосомы белком PARP1. Обнаружено, что dCas9 эффективно связывается с цДНК вблизи границы нуклеосомы как в присутствии, так и в отсутствии PARP1. Установлено, что dCas12a лучше, чем dCas9 распознает цДНК и в области диадной оси, и вблизи границы нуклеосомы, а PARP1 не влияет на эффективность этого взаимодействия.

Выводы. Способность белков dCas взаимодействовать с цДНК зависит от ее положения в нуклеосоме и отличается для разных вариантов dCas. Образование комплексов нуклеосома-PARP1 не мешает, а сопутствующая реорганизация структуры нуклеосомы может улучшать доступность цДНК в отдельных областях нуклеосомы для dCas.

Работа поддержана Минобрнауки РФ (проект No 075-15-2021-1062)

Секция «Физиология и медицинская биохимия»

ФМ1. Применение низкотемпературной гелиевой плазмы для исследования антиоксидантных свойств лекарственных препаратов на культуре клеток *Paramecium caudatum*

Г.Н. Абрашитов (gleb58a@mail.ru)¹, Г.А. Груздев¹, Д.М. Манченко¹, В.Г. Якунин²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра физиологии человека и животных, Россия, Москва

²Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра физики низких температур и сверхпроводимости, Россия, Москва

Введение. Холодная атмосферная плазма представляет собой ионизированный газ, имеющий температуру, близкую к комнатной. Воздействие данной плазмы на живые организмы может приводить к развитию «окислительного стресса» в клетках, за счет генерируемых плазмой активных форм кислорода и азота, а также других радикальных частиц. Растущее количество биомедицинских исследований требует поиска новых тестовых объектов для скрининга лекарственных препаратов в соответствии с современными биоэтическими требованиями, поэтому в качестве модельного объекта нами были выбраны клетки *Paramecium caudatum*.

Цель исследования. Рассмотреть эффективность применения низкотемпературной плазмы в изучении протекторных свойств антиоксидантных веществ на клеточной культуре *Paramecium caudatum*.

Методы. В нашей работе использовалась культура *Paramecium caudatum*. Численность клеток регистрировали во временных точках: 1, 3, 6, 24, 48 и 72 ч после воздействия в программе ImageJ (Фиджи) с plugin “counting cell”. Кроме того, оценивали параметр средней скорости движения клеток. Для изучения цитопротекторных эффектов лекарственных препаратов были взяты омепразол и венлафаксин в концентрациях $2 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-5}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Перед воздействием адаптировали клетки в течение 24 часов. Воздействие холодной He-плазмы проводилось в течение 5 минут. Статистический анализ проводили в программе “Statistica 10” с использованием two-way ANOVA. Достоверными считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты. При воздействии He-плазмы pH среды изменяется с 5,6 до 4. Гибель была максимальной через 3 ч и в контрольной группе составила 78 %. В группах с инкубацией омепразола и венлафаксина в концентрациях $2 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-5}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л через 3 часа после воздействия численность падает на 0; 13; 14 и 0; 2; 13 % соответственно для каждого препарата (при этом венлафаксин в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М проявил острую цитотоксичность). Показатели средней скорости передвижения клеток в растворе через 3 часа после воздействия падают в 2-2,5 раза по сравнению с контролем, а в группах с добавлением омепразола и венлафаксина в концентрациях $2 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-5}$ и $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л увеличиваются на 21; 9; 9 и 30; 8; 8 % соответственно. Все наблюдаемые отличия оказались значимыми по сравнению с контрольной группой.

Выводы. Присутствие в среде омепразола и венлафаксина практически полностью нейтрализовало окислительный эффект плазмы.

Оба исследуемых вещества показали приблизительно одинаковую степень протекции.

Использование низкотемпературной плазмы позволяет эффективно проводить оценку антиоксидантных свойств лекарственных препаратов.

ФМ2. Активация механизма аутофагии в ткани мозга крыс перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию

А.В. Алов (Aloff.anton@yandex.ru)¹, Н.Л. Туманова², А.В. Михель², Д.С. Васильев²

¹Санкт-Петербургский Государственный Университет, Россия, Санкт-Петербург

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Пренатальная гипергомоцистеинемия (пГГЦ) - состояние организма при повышенном уровне содержания в тканях токсичной аминокислоты гомоцистеина, которая способна вызывать нарушение развития головного мозга, сопровождающееся гибелью нейронов в постнатальном онтогенезе. Молекулярные механизмы клеточной гибели, задействованные в развитии этого патологического состояния слабо изучены. Нами была исследована возможность активации механизмов аутофагии в эмбриональном и постнатальном периодах онтогенеза пГГЦ крыс.

Методы. пГГЦ создавали путём перорального введения беременным самкам 0,15%-го водного раствора L-метионина ежедневно, начиная с четвертого дня после оплодотворения и до родоразрешения. Ткань коры и гиппокампа мозга потомства анализировали с использованием электронной микроскопии и иммунохимического метода. С целью проверки образования аутофаголизосом в плаценте и мозге плода при ГГЦ была изучена локализация белков аутофагосом (LC3B-II) и лизосом (Lamp2).

Результаты. Обнаружено появление большого количества аутофагосом в теменной коре пГГЦ потомства на P5-P20, что позволяет предположить активацию процессов аутофагии и в мозге плодов позднего пренатального периода. Флуоресцентный сигнал соответствовавший Lamp-2 локализовался в виде флуоресцирующих точек во всём объёме цитоплазмы большинства клеток как в мозгу эмбриона так и в ткани плаценты, что соответствует естественному распределению этого белка в цитоплазме всех клеток в норме. Флуоресцентный сигнал LC3B-II выявлялся в одиночных клетках плаценты и мозга пГГЦ эмбрионов. В пГГЦ группе клетки с сигналом LC3B-II встречались чаще, чем в контроле. При помощи набора Duolink® Proximity Ligation Assay была доказана колокализация сигналов маркерных белков LC3B-II и Lamp-2.

Выводы. Наличие колокализации этих белков указывает на возможность развития аутофагии в отдельных клетках ткани мозга плода и плаценты пГГЦ группы. В совокупности с наблюдениями аутофагосом на электронограммах мозга пГГЦ плодов, можно предположить активацию гибели одиночных клеток по механизму аутофагии, вызванной действием гомоцистеина.

Поддержано Российским научным фондом (№22-15-00393).

ФМЗ. Роль системы фосфорилирования пируватдегидрогеназы в адаптациях к нарушениям тиамин-зависимого метаболизма

Н.Р. Борисова (borisovanr@mail.ru)¹, А.В. Граф², В.И. Буник^{3,4}

¹*ПМГМУ имени И.М. Сеченова, Россия, Москва*

²*Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

³*Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

⁴*Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Производное тиамина, тиаминдифосфат (ТДФ) - кофермент реакций выработки энергии при деградации глюкозы и аминокислот, а также пентозофосфатного пути синтеза рибозы и НАДФН. При дефиците тиамина в первую очередь страдают ткани с высокими энергетическими потребностями: сердечная и нервная. ТДФ-зависимый фермент - пируватдегидрогеназа (ПДГ) - в составе полиферментного комплекса сопрягает гликолиз с циклом Кребса, поставляя субстрат цикла - ацетил-КоА. Активность ПДГ регулируется фос-форилированием в трех сайтах, наиболее значимым из которых является S293. 4 Изофермента киназ (PDK1-4) фосфорилируют ПДГ, а 2 изофермента фосфатаз (PDP1,2) дефосфорилируют ПДГ (10.1038/emm.2001.32). Цель работы: проанализировать сопряжение между системой фосфорилирования ПДГ в головном мозге, поведением и ЭКГ при ингибировании транспорта тиамина или дисфункции ТДФ-зависимых ферментов.

Методы. В течение 30-ти дней крысам ежедневно вводили ингибиторы транспорта тиамина метформин (150 мкг/кг) с ампролиумом (40 мкг/кг) (M+A, n=11) или антагонист ТДФ-зависимых ферментов окситиамин (1,5 мг/кг) (OT, n=15). Контрольным животным (n=12 в первой и n=11 во второй сериях) вводили физраствор. На 31-й день определяли параметры ЭКГ и поведения. Гомогенаты коры головного мозга подвергали денатурирующему электрофорезу с масс-спектрометрическим анализом (МС) (10.1038/emm.2001.32). Используя идентифицированные МС в гомогенатах пептиды, определяли нормированные на пептиды актина (3 пептида) и тубулина (3 пептида) уровни PDK1 (3 пептида), которая фосфорилирует все три сайта, PDK2 (2 пептида), обладающей наибольшей активностью в отношении сайта S293 (10.1111/jnc.14951), и PDP1 (3 пептида), дефосфорилирующей все сайты (10.1016/j.bbapap.2003.08.010).

Результаты. Ингибиторы транспорта тиамина (M+A) достоверно увеличивало уровень PDK1 и снижали отношение PDP1/PDK1, не влияя на уровень PDK2. Хотя усредненные по группе M+A параметры поведения и ЭКГ достоверно не отличались от контрольных, менялись характерные для контрольной группы соотношения системы фосфорилирования с поведением и ЭКГ. В отличие от ингибиторов тиаминного транспорта, OT изменял поведение, но не оказывал существенного влияния ни на уровни компонентов системы фосфо-рирования ПДГ, ни на их корреляции с поведением/ЭКГ.

Выводы. Система фосфорилирования ПДГ участвует в физиологических адаптациях организма к нарушению транспорта тиамина, но менее реактивна к ингибированию ТДФ-зависимых ферментов.

Благодарим проф. Тило Кэне (Университет Магдебурга, Германия) за проведение МС и к.б.н. Алешину В.А. - за ценные советы по обработке Данных МС. Гостема АААА-А19-119042590056-2.

ФМ4. Влияние блокады глюкокортикоидных рецепторов на поведение и структуру гиппокампа у самцов крыс, перенесших фокальную ишемию мозга

Д.Г. Валиева (valieva_d@mail.ru)^{1,2}, М.В. Назаткина³, О.А. Недозреева²

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Россия, Москва

³Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина, Россия, Москва

Введение. Фокальное повреждение мозга, возникающее вследствие перенесенного инсульта, часто приводит к отставленному появлению целого ряда когнитивных нарушений. Одним из возможных механизмов, которые приводят к таким нежелательным последствиям, является избыточная активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси в период ишемии. Результатом этого является повышенный выброс кортикостероидов в кровотоки. Увеличение концентрации глюкокортикоидов (ГК) и обусловленное этим активное поступление гормонов в мозг может приводить к повреждению церебральных структур и к последующим когнитивным нарушениям.

Методы. В работе ишемический инсульт моделировали у крыс методом окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) по Коизуми. Было исследовано 5 групп животных: интактные, ложнооперированные животные, получавшие раствор полипропиленгликоля (ППГ) или раствор антагониста ГК рецепторов мифепристона (МФ) в ППГ, и животные с ОСМА, которым вводили ППГ или МФ+ППГ. Раствор МФ в ППГ вводили в дозе 20 мг/кг массы тела за сутки до, в день операции и в течение 3-х дней после операции. Через 24 ч после последней инъекции отдельные группы крыс (n = 4-5) анестезировали, перфузировали 4% формальдегидом. Срезы мозга окрашивали по Нисслию и иммуногистохимически на наличие белков апоптоза (Bax), маркеры астроцитов (GFAP) и микроглии (Iba-1). Через 30 дней после операции у крыс (n = 8-10 в группе) вырабатывали условную реакцию пассивного избегания (УРПИ) для проверки состояния долговременной памяти.

Результаты. Ишемический инсульт приводил к нарушению сохранности УРПИ у крыс, что проявлялось в снижении латентного периода входа в темный отсек камеры через 24 ч после обучения. Введение блокатора ГК рецепторов МФ предотвращало негативное влияние ишемии, значимо улучшая показатели обучения в группе крыс, перенесших ОСМА и получавших МФ.

Была исследована структура гиппокампа, т.к. этот отдел участвует в процессах обучения и памяти у животных и может быть поврежден при ОСМА. ОСМА не приводила к снижению числа нейронов в клеточных полях CA1, CA3, CA4 гиппокампа и зубчатой извилине. Не было выявлено экспрессии проапоптозного белка Bax, хотя он четко детектировался в зоне ишемической полутени. Был проведен анализ изменений клеток глии.

Выводы. Таким образом, наблюдавшиеся нарушения памяти у крыс, перенесших ОСМА, не были связаны с гибелью клеток гиппокампа или активацией в них апоптоза. Введение МФ, антагониста ГК рецепторов, может предотвратить ухудшение памяти в отдаленный период после ишемии независимо от его непосредственного влияния на гиппокамп.

ФМ5. Эффекты вещества BGP-15 на функции митохондрий и массу скелетной мышцы при длительном снижении сократительной активности

М.А. Виноградов (*winogradow_matwej@outlook.com*)^{1,2}, М.А. Орлова², С.В. Другова², М.А. Машкин²

¹Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Институт медико-биологических проблем РАН, Россия, Москва

Введение. Гипокинезия снижает массу скелетных мышц, а также нарушает функции митохондрий и инсулиновую чувствительность мышц. Вещество BGP-15 (индуктор белков теплового шока 70) - перспективный препарат, оказывающий положительный эффект на чувствительность скелетных мышц к инсулину, а также на их окислительные возможности. Цель работы - изучить влияние длительного (28 суток) снижения сократительной активности скелетных мышц без и с введением BGP-15 на функции митохондрий и их массу.

Методы. Эффекты снижения двигательной активности мышц задней конечности (28 суток) и их реадaptации к нормальному уровню двигательной активности (3 суток) изучали на модели вывешивания мышей (C57BL/6) за хвост. Перед вывешиванием под кожу вживляли осмотическую помпу, содержащую физраствор или BGP-15 (5-8 самцов в каждой группе/временной точке). У всех животных выделяли и взвешивали *m. plantaris*. Дыхание митохондрий в пермеабелизированных мышечных волокнах оценивали на полярографе Oxygraph (Hansatech, Великобритания) при добавлении субстратов дыхательного комплекса I (2 мМ малат + 5 мМ пируват + 10 мМ глутамат) и 0,2 мМ АДФ для косвенной оценки чувствительности к АДФ, а также при последующем добавлении субстратов комплекса II и 5 мМ АДФ для оценки максимального АДФ-стимулированного дыхания.

Результаты. Вывешивание привело к падению массы *m. plantaris* примерно на 20% как в контрольной, так и в экспериментальной группе. После трех дней восстановления не наблюдалось повышения массы мышцы ни в одной из групп. Максимальное АДФ-стимулированное дыхание не изменилось ($p=0,12$) в группе с физраствором, но снизилось в группе, применявшей препарат ($p=0,03$). При восстановлении с физраствором наблюдалась тенденция к повышению скорости максимального АДФ-стимулированного дыхания ($p=0,09$); изменений в группе восстановления с BGP-15 не было выявлено ($p=0,11$). В группе с физраствором чувствительность к АДФ не изменилась ни после вывешивания, ни на 3-е сутки восстановления. Однако в группе, применявшей препарат, обнаружена тенденция ($p=0,055$) к повышению этого показателя при восстановлении после вывешивания.

Выводы. Хроническое Введение вещества BGP-15 не оказало влияние на потерю и восстановление мышечной массы и максимальное АДФ-стимулированное дыхание митохондрий; при этом наблюдалась тенденция к повышению чувствительности к АДФ во время восстановления после вывешивания.

ФМ6. Молекулярные механизмы действия агониста рецептора ГПП-1 лираглутида на адипогенную дифференцировку МСК

Е.Д. Волошина (*Lizaannaar@yandex.ru*)¹, Н.С. Волошин¹, К.Ю. Кулебякин^{1,2}

¹Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт Регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. В 2023 году по данным Всемирной Диабетической Федерации причиной смерти около 1,5 миллионов людей в мире стал сахарный диабет. Сахарный диабет 2-го типа (СД 2) является фактором развития ишемической болезни сердца, гипертонической болезни, инсульта, болезней почек и нарушений зрения. Распространенным подходом для борьбы с СД 2 типа являются препараты, разработанные на базе сигнальной системы глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1). ГПП-1 повышает секрецию инсулина клетками поджелудочной железы, а также регулирует пищевое поведение. Лираглутид - агонист рецептора ГПП-1 (рГПП-1) - одобрен в качестве терапии для больных СД 2 и ожирения, так как он эффективно снижает уровень глюкозы в крови и способствует снижению веса.

Важнейшую роль играет обновление жировой ткани - адипогенез. Адипогенез осуществляется мезенхимными стромальными клетками (МСК), которые способны дифференцироваться в адипогенном направлении под воздействием гормональных сигналов. Известно, что лираглутид специфически воздействует на МСК: он повышает экспрессию адипонектина, однако не влияет на накопление жировых капель. Адипонектин - гормон жировой ткани, проявляющий инсулино-сенситизирующие кардио- и нейропротекторные свойства. Однако молекулярный механизм действия лираглутида на адипогенез на данный момент неизвестен.

рГПП-1 относится к группе GPCR, он способен запускать два молекулярных каскада: Gas-опосредованный цАМФ-зависимый каскад, а также Р-аррестин-зависимый каскад.

Целью данной работы является изучение молекулярных механизмов действия агониста рГПП-1 лираглутида на адипогенную дифференцировку МСК.

Методы. В нашей работе мы выделяли МСК из подкожной жировой клетчатки живота человека, которые культивировали до получения 100% конфлюэнтности. Далее клетки дифференцировали в течение 14 дней в адипогенном направлении при постоянном добавлении лираглутида в концентрации 100 нМ совместно с ингибитором аденилатциклазы SQ22536, активатором аденилатциклазы форсколином, антагонистом рГПП-1 эксендином (9-39) или блокатором Р-аррестинового каскада барбадином. На 14-е сутки была произведена оценка накопления жировых капель с помощью флуоресцентной микроскопии. Также клетки были лизированы, из них была выделена тотальная РНК с последующей ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией на гены адипонектина, лептина и PPAR.

Результаты. Была выполнена оценка вклада цАМФ-зависимого и Р-аррестин-зависимого молекулярных каскадов в эффект повышения экспрессии адипонектина и лептина МСК в ответ на добавление лираглутида.

Выводы. Полученные данные дополняют картину влияния ГПП-1 на жировую ткань, а также открывают новые терапевтические возможности для коррекции СД 2 типа.

ФМ7. Особенности поведения мышей с нарушенной передачей сигнала через TNFR2

А.И. Воронцов (sasavoroncov71@gmail.com)^{1,2}, В.О. Небогатилов³, В.С. Гоголева², М.С. Друцкая²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра иммунологии, Россия, Москва

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

³Институт физиологически активных веществ ФГБУН ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН, Россия, Черноголовка

Введение. Фактор некроза опухоли (TNF) - цитокин, играющий важную роль в коммуникации иммунной и нервной систем. Широкий спектр действия TNF обусловлен наличием двух рецепторов - TNFR1 и TNFR2, которые отличаются профилем экспрессии на разных типах клеток и типом внутриклеточных сигнальных каскадов [PMID: 32083339]. Было показано, что фармакологическая блокировка TNF приводит к уменьшению признаков депрессивного поведения [PMID: 27752078], однако механизмы действия TNF и его рецепторов в регуляции поведения остаются малоизученными. Целью данной работы является исследование роли сигнального пути TNF/TNFR2 в формировании поведения.

Методы. Работу проводили на мышах дикого типа C57BL/6 и мышах с нарушенной передачей сигнала через TNFR2 (TNFR2*) [PMID: 30498033]. У мышей оценивали уровень агрессии и депрессивно-подобного поведения в тестах «Резидент-нарушитель» и «Принудительное плавание», соответственно. Далее проводили анализ продукции цитокинов в сыворотке крови, а также анализ продукции гормонов в гипофизе и гипоталамусе в наивном состоянии и сразу после проведения поведенческих тестов.

Результаты. Нарушение TNFR2 сигнального пути не оказывало влияния на уровень депрессивно-подобного состояния в тесте «Принудительное плавание». В то же время было обнаружено, что TNFR2* мыши чаще совершали атаки в тесте «Резидент-нарушитель», что указывает на возможное участие этого сигнального пути в формировании агрессивного поведения. Анализ продукции цитокинов в крови не выявил корреляции между уровнем продукции TNF и числом атак. Однако выявлено снижение уровня IL-6 в сыворотке TNFR2* мышей через 15 минут только после проведения теста «Резидент-нарушитель», коррелирующее с максимальным уровнем стресса. Предварительный анализ продукции тропных гормонов показал, что у TNFR2* мышей повышена реактивность гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси.

Выводы. Мыши с нарушением TNF/TNFR2 сигнального пути проявляют признаки агрессивного поведения в тесте «Резидент-нарушитель». Предполагается, что такое нарушение приводит к восприимчивости к стрессу и это может быть связано как с изменениями в продукции провоспалительных цитокинов, так и с изменениями в уровне продукции тропных гормонов гипофиза.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда №19-75-30032 и с привлечением аппаратной базы Центра коллективного пользования ИФАВ РАН (в рамках № FFSG-2024-0020)

ФМ8. Оценка влияния предварительного введения виндебурнола на развитие тревожно- фобического состояния и светобоязнь в модели хронической мигрени у мышей

А.Р. Гарифуллина (amina.garif@gmail.com)¹, А.Ф. Салихзянова¹,

¹Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Россия, Казань

Введение. Мигрень - неврологическое заболевание, основным и характерным симптомом которого является хроническая или эпизодическая головные боли. Помимо этого, симптоматика мигрени так же включает в себя фотофобию и повышенное тревожное состояние. Целью данной работы явилось изучение влияния виндебурнола на развитие тревожно-фобического состояния и светобоязнь в модели хронической мигрени у мышей.

Методы. Мыши были разделены на контрольную группу (n= 11) и группу, получавших в/б инъекции виндебурнола в концентрации 20 мг/кг в 1% твин в течение 10 дней (ВБ, n=11). Далее в обеих группах создавалась модель хронической мигрени инъекциями нитроглицерина (НГ) в концентрации 1мг/кг в течение 9 дней через день. Тревожно-фобическое состояние и светобоязнь оценивалось с помощью теста «Темно-светлая камера» по общему времени пребывания в светлой камере до и после инъекции НГ. С помощью метода конкурентного ИФА измерялось содержание кальцитонин-ген родственного пептида (CGRP) в плазме мышей с моделью хронической мигрени.

Результаты. Хроническое Введение НГ мышам контрольной группы вызывало значительное снижение базального времени пребывания в светлой камере от 71 ± 7 с до 6.8 ± 1.6 с, в то время как в группе ВБ наблюдалось снижение от 80 ± 5 с до 49 ± 7 с. Постинъекционные ответы контрольной группы значительно снизились на 7 день инъекции НГ и к концу эксперимента составили 6.8 ± 1.6 с, у животных группы ВБ постинъекционные ответы практически не отличались от начальных значений ($33,9 \pm 4,9$ с) даже после последней инъекции НГ ($34,5 \pm 4,6$ с). Результаты ИФА показали, что у мышей группы ВБ содержание CGRP (значения) в плазме ниже, чем у животных контрольной группы (значения).

Выводы. Предварительное Введение виндебурнола в модели хронической мигрени у мышей замедлило развитие тревожно-фобического состояния и светобоязни, а также привело к снижению содержания провоспалительного агента и биомаркера мигрени CGRP в плазме. Таким образом, можно предположить, что Введение виндебурнола имеет положительное влияние на купирование симптомов мигрени.

ФМ9. Значение липидного микроокружения в бета2-адренергической регуляции нервно-мышечной передачи

Ч.Р. Гафурова (gafurova7090@gmail.com)^{1,2}, А.Н. Ценцевицкий¹, А.М. Петров^{1,2}

¹Казанский институт биохимии и биофизики, Россия, Казань

²Казанский государственный медицинский университет, Россия, Казань

Введение. Синаптический регион нервно-мышечных соединений имеет уникальный белково-липидный состав, в частности, в них наблюдается высокое содержание сфингомиелина и холестерина, формирующих липидные рафты. Липидные рафты содержат рецепторы, вовлечённые в синаптическую передачу и её регуляцию.

Одними из таких рецепторов являются 2-адренорецепторы, обеспечивающие чувствительность нервно-мышечных синапсов к действию катехоламинов. Однако на данный момент значение целостности липидных рафтов для реализации эффектов активации 2-адренорецепторов остается не изученной.

Методы. С использованием фармакологических подходов, флуоресцентных FM-красителей и электрофизиологических методов мы исследовали роль липидного окружения в регуляции сигнализации, сопряженной с 2-адренорецепторами, в нервно-мышечных синапсах диафрагмы мышей.

Результаты. Агонист 2-адренорецепторов фенотерол (1-10 мкМ) усиливал освобождение FM-красителей из синаптических везикул и замедлял развитие депрессии секреции нейромедиатора при высокочастотной активности (20 Гц), а также потенцировал облегчение освобождения нейромедиатора в начале каждого нового эпизода активности при прерывистой стимуляции нерва.

Гидролиз сфингомиелина мембран, окисление мембранного холестерина и хроническое блокирование синтеза холестерина аторвастатином приводят к дестабилизации липидных рафтов. В этих условиях наблюдалась инверсия эффекта активации 2-адренорецепторов: происходило уменьшение темпа экзоцитоза и усиление депрессии секреции нейромедиатора. Схожим образом, оксихолестерин подавлял опосредуемое фенотеролом усиление экзоцитоза.

2-адренорецепторы могут оказывать эффекты как через стимулирующий G_s -, так и ингибирующий G_i -белки. С использованием коклюшного токсина (РТХ), блокирующего G_i -белок, и ингибитора аденилатциклазы показали, что гидролиз сфингомиелина приводит к переключению сигнализации 2-адренорецепторов на G_i -белок-зависимую сигнализацию, в результате наблюдается инверсия эффекта фенотерола.

Выводы. Сфингомиелин и холестерин, образующие липидные рафты, являются важными модуляторами 2-адренергической регуляции нервно-мышечной передачи. Дестабилизация липидного окружения приводит к альтерациям во внутриклеточном сигналинге, опосредуемом 2-адренорецепторами, что выражается угнетением нервно-мышечной передачи.

Финансовая поддержка: грант РФФ №23-75-10022

ФМ10. Изменение экспрессии цитокинов в лимбической системе головного мозга крыс при воздействии алкоголя

П.Д. Игнатова (ignatova.polly@yandex.ru)¹, С.О. Ереско^{1,2}, М.И. Айрапетов^{1,3}

¹Институт экспериментальной медицины, Россия, Санкт-Петербург

²СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Россия, Санкт-Петербург

³Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Длительная алкоголизация приводит к активации микроглии и возникновению воспалительного процесса в головном мозге, что характеризуется изменением цитокинового профиля. В данной работе рассматривалось изменение мРНК провоспалительных IL1beta и IL6, противовоспалительного цитокина IL11 в структурах лимбической системы головного мозга длительно алкоголизированных крыс.

Методы. Условия длительной алкоголизации моделировались на крысах Wistar путем перорального введения 20%-ого раствора этанола через зонд (2 г/кг) в течение 1 месяца. Контрольная группа перорально получала эквивалентное количество воды в течение того же срока. На 7-ой день отмены алкоголя проводился забор головного мозга путем декапитации. Далее была получена суммарная РНК, выполнена обратная транскрипция и поставлены реакции реал-тайм ПЦР. Данные были статистически обработаны с использованием критерия достоверности Манна-Уитни.

Результаты. Изменения содержания мРНК IL1beta было различно в структурах головного мозга: отсутствие значимых изменений в гиппокампе, снижение в 1,41 раз в префронтальной коре, увеличение в 5,21 раз в миндалевидном теле и в 1,42 раза в прилежащем ядре. Изменения содержания мРНК IL6 не были выраженными в гиппокампе и миндалевидном теле, отмечено снижение в 2,21 раза в префронтальной коре и увеличение в 1,62 раза в прилежащем ядре. мРНК IL11 единственный повышался (в 7,94 раза) в гиппокампе, также повышение отмечено в миндалевидном теле в 3,57 раз, в прилежащем ядре мРНК IL11 снизилась в 3,86 раз, в префронтальной коре изменений цитокина не выявлено.

Выводы. На данный момент не выявлено зависимости в изменении цитокинового профиля в структурах лимбической системы длительно алкоголизированных крыс, поэтому целесообразно оценить изменения экспрессии данных цитокинов в различные сроки отмены алкоголя с дальнейшим сравнением результатов. В качестве перспективы рассматривается применение данных результатов для оценки эффективности фармакологической коррекции нейровоспаления.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (2022-2025 гг.) «Поиск молекулярных мишеней для фармакологического воздействия при аддиктивных и нейроэндокринных нарушениях и создание новых фармакологически активных веществ, действующих на рецепторы ЦНС», шифр FGWG-2022-0004

ФМ11. Уровень белков плотных контактов в эндотелиях сосудов головного мозга мышей mdx

И.Г. Исаева (st076150@student.spbu.ru)¹, И.А. Разговорова¹, А.Г. Марков^{1,2}

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

²Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, лаборатория interoцепции, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Миодистрофия Дюшенна (МДД) - моногенное заболевание, вызванное потерей белка дистрофина. Помимо утраты мышечной силы и подвижности, при МДД нередко развиваются психоневрологические нарушения, такие как тревожность и депрессия. Предполагается, что они ассоциированы с нарушением гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), поскольку полноразмерный белок дистрофин является субмембранным компонентом эндотелиоцитов сосудов головного мозга. Белки плотных контактов, в частности клаудин-5 и окклюдин, играют ключевую роль в регуляции проницаемости ГЭБ. Влияние потери пол-норазмерного дистрофина в эндотелиоцитах на белки плотных контактов при МДД остаётся неизученным.

Методы. В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) оценивались локомоторная активность и уровень тревожности у взрослых самцов мышей mdx и C57BL. Для выявления депрессивно-подобного состояния использовался тест

Порсолта, в котором в течение 5 минут принудительного плавания регистрировалось время неподвижности животных. Далее определяли уровни клаудина-5 и окклюдина в лобных долях головного мозга методом вестерн-блот.

Результаты. У мышей mdx обнаружено снижение двигательной активности в ПКЛ по сравнению с контролем. Мыши mdx не отличались от C57BL по количеству болюсов, времени, проведенному в открытых рукавах и отношению дистанции, пройденной в открытых рукавах к общей пройденной дистанции. Тест Порсолта показал отсутствие у мышей mdx депрессивно-подобного состояния. У мышей mdx не наблюдалось достоверного изменения уровня окклюдина и клаудина-5 в головном мозге по сравнению с контролем.

Выводы. Потеря полноразмерного дистрофина в эндотелии сосудов головного мозга не приводит к увеличению тревожности и не вызывает изменения уровня важных для функционирования ГЭБ белков плотных контактов и, вероятно, не нарушает барьерную функцию ГЭБ.

ФМ12. Быстрая оценка эффективности действия антибактериальных препаратов разных классов и их композиций с использованием биолюминесцентной тест-системы на основе живых клеток *E. coli*

С.С. Каминская (kaminsk1902@yandex.ru)^{1,2}, Г.Ю. Ломакина¹, Н.Н. Угарова¹

¹Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²МГТУ имени Н.Э. Баумана, факультет фундаментальных наук, Россия, Москва

Введение. Цель данной работы - изучение антибактериальной активности и сравнение эффективности действия антибиотиков разных классов - полимиксинов и аминогликозидов, а также комбинированного препарата на основе гентамицина с добавлением наночастиц серебра.

Методы. Для изучения эффективности действия антибактериальных агентов использовали биолюминесцентную тест-систему на основе живых клеток *E.coli*, продуцирующих термостабильную рН-нечувствительную люциферазу светляков, позволяющую определять кинетику изменения содержания АТФ и люциферазной активности внутри и вне клеток при повышенных температурах.

Результаты. В присутствии гентамицина (0 - 0,1 мг/мл) отмечалось доза-зависимое замедление роста клеток по сравнению с контрольным образцом, увеличение уровня внеклеточного АТФ и люциферазы (увеличение проницаемости клеточной мембраны) и блокирование синтеза эндогенной люциферазы (ингибирование рибосом), что согласуется с механизмом действия аминогликозидов - гентамицин проникает через клеточную мембрану и встраивается в 30S-субъединицы рибосом, нарушая трансляцию белка.

Совместное действие гентамицина и коллоидного серебра изучали в широком диапазоне концентраций агентов для определения МБК, концентрацию клеток варьировали от 10 до 300 млн кл/мл. Степень гибели клеток зависела от концентрации препарата, причем присутствие серебра повышало эффективность действия гентамицина в 10 раз.

Мишенью действия полимиксинов является система синтеза АТР, локализованная на внутренней мембране клетки. Это приводит к резкому снижению до нулевых значений содержания внутриклеточного АТР_{in} при незначительном увеличении внеклеточного АТР_{out}, т.е. синтез АТР_{in} прекращается, а оставшийся АТР_{in} расходуется внутри клетки, вызывая ее гибель.

Выводы. Главным отличием полимиксинов от аминокликозидов является то, что в присутствии полимиксина наблюдали снижение уровня АТР_{in} до нулевых значений (полная гибель клеток), в то время как в присутствии гентамицина наблюдали остаточное содержание АТР_{in}, что свидетельствует о сохранении клетками жизнеспособности (образование персистеров). Действительно, после отделения гентамицина (в отличие от полимиксина), клетки возобновляли рост в свежей питательной среде.

Таким образом, биолюминесцентная тест-система может использоваться для скрининга, оценки эффективности и изучения механизма действия антибактериальных агентов и новых лекарственных форм.

Работа выполнена в рамках госзадания МГУ им. М.В. Ломоносова - номер ЦИТИС 121041500039-8.

ФМ13. Новые производные изоалантолактона как платформа для создания препаратов против опухолей молочной железы и ингибиторов агрессивного фенотипа клеток мультиформной глиобластомы

Д.О. Кичкина (daryakichkina@mail.ru)^{1,2}, С.С. Патрушев^{2,3}, Э.Э Шульц³, А.В. Марков¹

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

²Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск ³Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Изоалантолактон - сесквитерпеновый лактон, проявляющий широкий спектр биологических активностей, в том числе противоопухолевый потенциал. Учитывая доказанную способность изоалантолактона проникать сквозь гемато-энцефалический барьер, данное соединение является перспективным кандидатом для разработки лекарственных агентов против опухолей головного мозга. С целью усиления фармакологического потенциала изоалантолактона, нами было синтезировано 27 его новых производных, несущих различные азотсодержащие заместители.

Методы. Оценку цитотоксичности производных изоалантолактона проводили с помощью МТТ-теста (48 ч). Механизм действия лидерного соединения **8c** исследовали методом проточной цитометрии (окраска клеток Annexin V- FITC/PI (апоптоз/некроз), JC-1 (митохондриальный мембранный потенциал), DCFDA (продукция активных форм кислорода)). Способность соединений проникать сквозь гемато-энцефалический барьер определяли с помощью платформ AlzPlatform и PreADMET. Исследование антиглиобластомного потенциала включало оценку подвижности клеток (метод зарастания царапины), их адгезионных свойств (ТурпLE тест), клоногенного потенциала, молекулярное моделирование взаимодействия соединения-лидера с глиобластома-ассоциированными белковыми мишенями

(network pharmacology анализ, Autodock Vina).

Результаты. Показано, что новые производные изоалантолактона способны вызывать гибель опухолевых клеток в микромолярных концентрациях. Идентифицировано соединение **8с**, обладающее наибольшим уровнем цитотоксичности и селективности и вызывающее гибель клеток MCF-7 в результате запуска окислительного стресса и митохондриального пути апоптоза. С использованием *in silico* подхода выявлено восемь производных изоалантолактона, потенциально способных проникать сквозь гемато-энцефалический барьер, среди которых идентифицировано производное **9**, эффективно подавляющее в нетоксичных концентрациях подвижность, клоногенные и адгезивные свойства клеток гли-областомы различного происхождения. С помощью молекулярного моделирования установлено, что анти-глиобластомный потенциал соединения **9** может быть связан с его прямым взаимодействием с белком теплового шока HSP90- альфа ($\Delta G = -9,8$ ккал/моль).

Выводы. Исследуемые производные изоалантолактона проявили выраженную противоопухолевую активность. Выявленные соединения-лидеры **8с** и **9** могут рассматриваться как перспективные платформы для разработки новых противоопухолевых кандидатов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 23-14-00374.

ФМ14. Физиологическое типирование линий мышей, нокаутных по генам PARK2, α , β , γ синуклеинов

К.Е. Кияница (karill2001@mail.ru)¹, Д.В. Серебряная¹, М.Л. Ловать¹

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. В настоящее время, несмотря на активный поиск животных моделей болезни Паркинсона (БП), наблюдается лишь совпадение отдельных признаков патологии, без совокупной картины заболевания, часто связанной с полигенным влиянием на развитие заболевания [1,2]. Среди разнообразия признаков, характерных для генетических моделей БП, важно выделить особенности, отражающие общую патологию и симптомы болезни. Так, белок Parkin участвует в поддержании белкового и митохондриального гомеостаза, продукты генов синуклеинов ответственны за синаптическую передачу и выживаемость дофаминовых нейронов в черной субстанции. Целью данной работы является выявление двигательного дефицита и оценка общей дегенерации мозга у мышей разных линий, нокаутных по генам PARK2, α , β , γ синуклеинов.

Методы. В данной работе 4 группы мышей 4-х месячного возраста (нокаутные по генам PARK2 (n=31), α (n=58), β (n=35), γ синуклеинов (n=10)) и мыши дикого типа (n=26) были протестированы в тестах “Открытое поле”, “Сужающаяся дорожка”, “Ротарод”. Для выявления потенциальных различий между астроцитами контрольных и опытных животных, были получены первичные культуры астроцитов и проведено их иммуноокрашивание с использованием антител, специфичных к GFAP. Выживаемость клеток оценивали с использованием красителя Аламар Blue.

Результаты. В тесте “Открытое поле” было выявлено увеличение отношения параметров движения/неподвижности, большее значение ускорения у мышей, нокаутных по 7 синуклеину, что говорит о нарушении двигательной активности, и снижение тревожности в группах α , β синуклеина. На “Сужающейся дорожке”

был выражен сенсомоторный дефицит у мышей, нокаутных по α , β синуклеину, при этом на “Ротароде” наблюдали снижение максимума времени удержания на установке в группе мышей, нокаутных по гену PARK2. Во всех опытных группах потребовалось больше попыток для достижения максимума удержания на установке “Ротарод”, что указывает на ухудшение способности к обучению. Морфология астроцитов, полученных из мозга контрольных и опытных животных, не отличалась. Существенных различий в количестве и распределении GFAP в клетках контрольных и нокаутных по различным синуклеинам животных выявлено не было. Однако было выявлено снижение выживаемости астроцитов во всех опытных группах.

Выводы. Следовательно, анализ совокупности поведенческих параметров показал, что мыши, нокаутные по 7 синуклеину, имеют более выраженные моторные нарушения, чем мыши в группах α , β , PARK2. Для всех групп характерно снижение способности к обучению, однако у α синуклеиновых мышей данный признак более выражен. При этом во всех опытных группах наблюдали снижение выживаемости астроцитов при неизменной морфологии.

Литература

1. Cherian, A., & Divya, K. P. Genetics of Parkinson’s disease. Acta Neurologica Belgica, 120(6), 1297-1305 (2020).
2. Kalia, Lorraine V, Anthony E Lang, and Gloria Shulman. “Parkinson’s Disease.” The Lancet 386 (9996): 896-912 (2015).

ФМ15. Иммунный оксистерин как мышечный протектор в условиях митохондриальной дисфункции

Е.А. Кузнецова (eva.korshak@mail.ru)^{1,2}, Г.Ф. Закурьянова^{2,3}, А.М. Петров^{2,3}

¹Казанский федеральный университет, Россия, Казань

²Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Россия, Казань ³Казанский государственный медицинский университет, Россия, Казань

Введение. Регенерация мышечной ткани осуществляется при участии макрофагов, которые являются основными продуцентами 25-гидроксихолестерина (25-ГХ). Его синтез ферментом холестерин 25-гидроксилазой во много раз усиливается при воспалении. Ранее нами была показана способность 25-ГХ устранять нервно-мышечные нарушения в диафрагме мыши в модели бокового амиотрофического склероза. Целью текущего исследования стала оценка способности 25-ГХ модулировать последствия митохондриальной дисфункции в диафрагмальной мышце.

Материалы и Методы. В качестве объекта выбран препарат диафрагмальной мышцы мыши. Эксперименты проведены с использованием метода флуоресцентной микроскопии и специфических красителей, позволяющих оценить уровни цитозольного и митохондриального кальция, митохондриальную продукцию активных форм кислорода (АФК), а также перекисное окисление липидов в плазмалемме.

Результаты. 25-ГХ повышал концентрацию цитозольного кальция, что подавлялось блокаторами мембранных эстрогеновых рецепторов альфа (ЭР) и инозитолтрифосфатных (ИТФ)-рецепторов саркоплазматического ретикулула (СПР).

Митохондриальная дисфункция вызывалась антимицином А, блокатором III комплекса электрон-транспортной цепи митохондрий. Антимицин А увеличивал продукцию АФК митохондриями, стимулировал накопление в них кальция, а также вызывал деполяризацию мембраны митохондрий. Это сопровождалось перекисным окислением липидов мембраны.

25-ГХ подавлял вызванные антимицином А митохондриальные изменения и перекисное окисление сарколеммы. В случае хелатирования внутриклеточного кальция и блокады ЭР и ИТФ-рецепторов антиоксидантное действие 25-ГХ не наблюдалось.

Аналогичный эффект выявлен при индукции воспаления внутримышечным **Введением** липополисахарида, что сопровождается усилением эндогенной продукции 25-ГХ.

Выводы. 25-ГХ запускает зависимые от ЭР сигнальные пути, способствующие защите мышечных волокон от митохондриальной дисфункции, вызванной антимицином А. Вероятно, его действие связано с увеличением цитозольного кальция за счет его выброса из СРР через ИТФ-рецепторные каналы. В свою очередь, это может препятствовать накоплению ионов кальция в митохондриях (через неидентифицированный механизм) и, как следствие, митохондриальному окислительному стрессу.

Положительные эффекты усиленной эндогенной продукции этого оксистерина в условиях воспаления и при нарушении митохондриальной работы указывают на возможность использования 25-ГХ в терапевтических целях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-75-10022.

ФМ16. Экспрессия микро-РНК miR-9-3p и miR-132 в гиппокампе мышей линии C57Bl/6 при хронической зависимости от морфина

В.А. Леваневская (v.levanevskaya@g.nsu.ru)¹

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Факультет Естественных Наук, Россия, Новосибирск

Введение. Наркотическая зависимость до сих пор остается одной из наиболее социально значимых проблем. Несмотря на обилие исследований в этой области, многие механизмы всё ещё неизвестны. Сейчас активно исследуются эпигенетические механизмы зависимости. В частности, изучается роль микро-РНК - универсальных маркеров разных патологических процессов, в том числе - нарушения процесса синаптической пластичности, вызываемого морфином. В центральной нервной системе широко распространены miR-9-3p и miR-132, которые вовлечены в процессы синаптической пластичности, роста и ветвления дендритов и формирования нейронных сетей.

Методы. Эксперименты проводили на самцах мышей линии C57Bl/6 (возраст 6-8 нед.). Животных с хронической зависимостью от морфина получали по протоколу [1], контрольным мышам вводили физиологический раствор по той же схеме, после чего у животных выделяли гиппокамп, разделяя его на 4 части в соответствии с двумя

типами асимметрии (лево-правая и дорзо-вентральная). Впоследствии определяли уровень экспрессии микро-РНК miR-9-3p и miR-132 методом ПЦР.

Результаты. Показано достоверное снижение экспрессии miR-9-3p в левом и правом дорзальном и в правом вентральном гиппокампе у мышей с хронической зависимостью от морфина.

Экспрессия miR-132 в гиппокампе мышей с хронической морфиновой зависимостью не менялась, что в целом соотносится с уже имеющимися данными, ряд которых указывает на повышение экспрессии данной микро-РНК, тогда как другие исследования изменений не обнаруживают.

Выводы. 1. У животных с хронической зависимостью от морфина достоверно снижается уровень экспрессии miR-9-3p в трех отделах гиппокампа, кроме левого вентрального, в то время как уровень экспрессии miR-132 в гиппокампе не изменяется.

2. Действие на экспрессию miR-9-3p может являться одним из механизмов нарушения синаптической пластичности гиппокампа у животных с хронической зависимостью от морфина.

Литература

1. Mamiya T., Noda Y., et al. Involvement of cyclic AMP systems in morphine physical dependence in mice: prevention of development of morphine dependence by rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor// Br J Pharmacol. - 2001 Mar. - 132(5):1111-7.

ФМ17. Животная модель контролируемого повреждения роговицы для полуколичественной оценки его исходов

М.А. Лобанова (m.a.lobanova571@gmail.com)¹, М.М. Хандохин², Е.А. Слободкина³,

П.И. Макаревич^{1,3}, Р.Ю. Еремичев^{1,3}

¹Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Патологические изменения структуры роговицы входят в состав основных причин слепоты, уступая только катаракте, глаукоме и возрастной макулярной дегенерации. Оценка подходов, направленных на восстановление нормального строения роговицы, требует создания модели её контролируемого повреждения с возможностью полуколичественного анализа ключевых структурных изменений: патологического неоангиогенеза и формирования бельма. Такая модель позволит строже и более точно обнаруживать и описывать эффекты выбранного действующего вещества на изучаемые процессы.

Методы. На роговицы наркотизированных мышей линии C57BL/6 накладывали круги из фильтровальной бумаги, смоченные растворами NaOH разных концентраций (от 0 до 2М). Через 30 сек глаза промывали 10 мл физраствора. На 21 сутки после щелочного ожога мышей выводили из эксперимента и получали общие изображения глаз при помощи стереомикроскопа, после чего их фиксировали в формалине, а роговицы исекали для дальнейшего анализа. Иммуногистофлуоресцентное мечение цельных роговиц на маркеры кровеносных (CD31) и лимфатических (LYVE1) сосудов проводили в течение 3 суток, после чего получали их объемные изображения при

помощи конфокальной микроскопии. Процессинг и статистическую обработку полученных результатов выполняли в программе Fiji и R. Непрозрачность роговицы оценивали по шкале Anderson и соавт., а степень неоваскуляризации – по длине и объему сосудистого русла.

Результаты. В наших экспериментах непрозрачность роговицы наблюдалась сразу после нанесения щёлочи. По-видимому, это было связано с некрозом тканей, поскольку помутнение становилось более выраженным при увеличении концентрации используемого раствора. К 21 суткам степень непрозрачности в разных группах изменилась неодинаково. При использовании NaOH в концентрациях 0,25М и 0,5М роговицы не отличались от контрольных (прозрачны, сосуды отсутствуют). При использовании концентраций 1М и 2М у всех животных формировалась выраженное бельмо и происходил неоваскуляризация, степень которого была выше в 2М. Таким образом, мы определили две воспроизводимо работающие в нашей модели концентрации NaOH с различной выраженностью неоваскуляризации.

Выводы. В ходе работы была отработана воспроизводимая методика нанесения раствора щёлочи на роговицу мыши, и определены возможности субъективной (шкальной) оценки формирования бельма. Кроме того, разработан метод полуколичественного измерения неоваскуляризации в роговице, что позволило выявить возрастание его выраженности при увеличении концентрации щёлочи. Таким образом, нам удалось получить животную модель контролируемого повреждения роговицы, позволяющую на основе описательных статистик рассчитать объем экспериментальных групп для обнаружения статистически значимого эффекта исследуемых веществ на неоваскуляризацию и формирование бельма роговицы.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова

ФМ18. Использование метаболитов и биомаркеров для диагностики послеоперационного менингита у пациентов нейрохирургического профиля

П.А. Мейнарович (pmejnarovic@gmail.com)^{1,2}, Е.А. Черневская², А.К. Паутова², Е.А. Сорокина²

¹Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Лаборатория метаболизма при критических состояниях, Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А.Неговского, Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Россия, Москва

Введение. Диагностика послеоперационного менингита является важной задачей в нейрохирургии, поскольку используемые критерии не являются специфичными (повышение уровня нейтрофилов в ликворе, менингеальные симптомы и др.). В предыдущей работе[1] были получены данные о прогностической значимости пара-гидроксифенилмолочной кислоты (ROC=0.734) и интерлейкина-6 (ROC=0.785) для вторичного менингита у пациентов нейрохирургического профиля. Цель текущего исследования - показать возможность улучшения прогностической значимости метаболитов и биомаркеров в ликворе за счет использования методов машинного обучения.

Методы. Пациентов нейрохирургического профиля разделили на 2 группы на основании клинического анализа ликвора - с подозрением (n=34) и без

подозрения на вторичный менингит (n=48). В образцах ликвора методом ГХ-МС измерили концентрации метаболитов: бензойная - БК, гомованилиновая - ГВК, пара-гидроксифенилмолочная - п-ГФМК, янтарная - Янт., фумаровая кислоты - Фум. Биомаркеры измерили методом ИФА: интерлейкин-6 - ИЛ-6, белок S100, нейронспецифическая енолаза - NSE, 5-гидроксииндолуксусная кислота - 5ГИУК. Полученные данные проходили преобработку с помощью метода PLS и после этого использовались для обучения модели SVM (Sklearn, Python). Для оценки качества использовали следующие метрики: accuracy (точность), f1, precision (прецизионность), recall (полнота), ROC-AUC.

Результаты. В ходе исследования была обучена модель машинного обучения SVM с использованием метаболитов и биомаркеров. Получены метрики качества: accuracy = 0.80, f1 = 0.752, precision = 0.785, recall = 0.738, ROC-AUC = 0.876. ROC-AUC для данной модели больше, чем для однофакторных моделей с ИЛ-6 или п-ГФМК из исследования[1].

Выводы. Использование модели SVM, обученной на комбинации метаболитов и биомаркеров, эффективнее по сравнению с однофакторными моделями (п- ГФМК или ИЛ-6) для диагностики менингита у пациентов после нейрохирургических вмешательств.

Литература

1. Pautova, A.K.; Meglei, A.Y.; Chernevskaia, E.A.; Alexandrova, I.A.; Beloborodova, N.V. 4-Hydroxyphenyllactic Acid in Cerebrospinal Fluid as a Possible Marker of Post-Neurosurgical Meningitis: Retrospective Study. J. Pers. Med. 2022, 12, 399

ФМ19. Продуцируемые NADPH-оксидазами АФК способствуют сокращению системных, но не легочных артерий крыс

Е.В. Моргацкая (e.morgatskaia@gmail.com)¹, Д.К. Гайнуллина¹, А.А. Швецова¹

¹Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Активные формы кислорода (АФК) обладают важной вазомоторной ролью, т.е. участвуют в регуляции тонуса сосудов. Показано, что АФК могут способствовать как расслаблению, так и сокращению артерий. NADPH- оксидазный ферментативный комплекс (NOXs) является одним из главных источников АФК в клетках кровеносных сосудов. Мы предположили, что вазомоторная роль продуцируемых NOXs АФК в сосудах малого и большого кругов кровообращения различается. Таким образом, целью нашей работы стало сравнение экспрессии мРНК и функционального вклада NOXs в регуляцию сократительных ответов легочных артерий и артерий большого круга кровообращения (брыжейки и почки).

Методы. Эксперименты проводили на половозрелых самцах крыс Wistar. В работе оценивали экспрессию мРНК каталитических субъединиц различных изоформ NOXs в ткани артерий при помощи ПЦР в реальном времени. Сократительные ответы артерий брыжейки (2-3го порядка ветвления), почки (междольевых артерий) и легкого (3го порядка ветвления) на агонист рецепторов тромбосана A2 U46619 регистрировали в изометрическом режиме с использованием системы wire myograph. Функциональный вклад NOXs оценивали с использованием пан-ингибитора VAS2870.

Результаты. Во всех исследуемых артериях мРНК NOX2 и NOX4 была наиболее представлена. При этом содержание мРНК NOX4 не различалось между исследуемыми сосудами, тогда как содержание мРНК NOX2 в легочных артериях было примерно в 10 раз выше по сравнению с артериями брыжейки и почки. Однако в функциональных экспериментах ингибитор NOXs VAS2870 (3 мкМ) не оказал влияния на сократительные ответы легочных артерий, но привёл к выраженному ослаблению сокращения артерий почки и брыжейки. При этом эффект ингибитора был более выражен в сосудах брыжейки, чем в сосудах почки: площадь под кривой в присутствии VAS2870 относительно контроля в артериях брыжейки составила $25 \pm 9 \%$, а в артериях почки $67 \pm 11 \%$ ($p < 0.05$, непарный t-тест).

Выводы. Таким образом, мы показали, что АФК, продуцируемые NOXs, обладают проконстрикторным влиянием в сосудах брыжейки и почки. При этом в артериях брыжейки вазомоторная роль этих АФК выражена сильнее, чем в артериях почки. В то же время, несмотря на высокое содержание мРНК NOXs в легочных артериях, АФК, продуцируемые ими, не проявляют вазомоторной роли в этих сосудах. Не исключено, что вклад продуцируемых NOXs АФК в артериях малого круга кровообращения проявляется в условиях гипоксии, что является предметом будущих исследований.

ФМ20. Исследование маточного цикла *Acomys sahirinus* как перспективного объекта для выяснения механизмов обновления эндометрия

Н. Д. Николаева (nd.nikolaeva@mail.ru)¹, Е.А. Слободкина², В.С. Попов^{2,3}, П.И. Макаревич^{2,3}, Р.Ю. Еремичев^{2,3}

¹*Кафедра эмбриологии, биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

²*Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

³*Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Исследование механизмов обновления эндометрия затруднено из-за отсутствия релевантной животной модели. В 2017 году группой Dickinson было показано наличие менструального цикла у египетской иглистой мыши (*Acomys sahirinus*) и было предложено использовать данный вид для исследований в этой области (Bellofiore и соавт., 2017). Однако среди опубликованных работ прошлых лет, посвященных этому же вопросу, о подобных находках не сообщалось (Peitz и соавт., 1981). В настоящей работе мы поставили перед собой задачу проверить наличие менструации у *Acomys sahirinus* ввиду перспективности этой животной модели для дальнейших фундаментальных и прикладных исследований.

Методы. От самок иглистых мышей (n=10) в возрасте 12-16 недель мы ежедневно получали влагалищные мазки с последующей гистологической окраской, с целью определения цитологических изменений содержимого влагалища в динамике маточного цикла. В следующем цикле мы также забирали влагалищные смывы для постановки пробы на скрытую кровь. У 5 животных в секреторной фазе забирали матки, которые фиксировали в растворе формалина и получали макрофотографии, после чего проводили гистологическое исследование срезов ткани, окрашенных гематоксилином-эозином.

Результаты. По нашим наблюдениям общая продолжительность маточного цикла у *Acomys sahirinus* составила от 7-11 суток. Цитологическое исследование мазков

показало сопоставимые с опубликованными данными изменения клеточного состава за исключением эритроцитов, которых мы не обнаружили, причем проба на скрытую кровь также дала отрицательные результаты. Макроскопическая картина матки одной из исследуемых самок указывала на наличие изменений, характерных для менструации (отечность, кровоизлияние в ткани), а гистологическое исследование также выявило увеличение количества эритроцитов в эндометрии данной особи.

Выводы. Маточный цикл *Acomys cahirinus* отличается от такового у лабораторных мышей или крыс как по продолжительности, так и по происходящим в эндометрии процессам. Отсутствие крови в отделяемом из половых путей исследуемых животных не позволяет обсуждать наличие у них менструального кровотечения характерного для человека. Однако изменения эндометрия в секреторной фазе можно описать как менструальноподобную реакцию. Более детальное изучение механизмов этих изменений позволит выявить преимущества и ограничения *Acomys cahirinus* как нового объекта для изучения механизмов обновления эндометрия.

ФМ21. Влияние антидепрессантов на вызванные кортикостероном изменения экспрессии нейротрофических факторов в астроцитах крысы *in vitro*

А.Н. Новоженова (novozhenovaan@my.msu.ru)¹, О.В. Долотов^{1,2}

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Введение. Считается, что терапевтические эффекты антидепрессантов обусловлены повышением уровней моноаминов в синаптической щели, однако предполагается наличие других механизмов антидепрессантной активности [1]. Одним из таких механизмов является стимуляция антидепрессантами уровней экспрессии ряда нейротрофических факторов (прежде всего, BDNF) в клетках мозга [2]. Предполагается также, что развитие депрессии при хроническом стрессе связано с подавлением экспрессии этих факторов при длительном повышении уровней глюкокортикоидов. Целью данной работы являлось изучение влияния представителей различных классов антидепрессантов на жизнеспособность астроцитов крысы *in vitro* и экспрессию ключевых нейротрофических факторов в присутствии кортикостерона.

Методы. В качестве объекта исследования использовали первичные гиппокампальные астроциты новорожденной крысы, а также клетки астроцитомы крысы линии С6. Кортикостерон (0.1 и 1 мкМ) и амитриптилин или флуоксетин вносили в культуральную среду однократно или на 1, 3, 5 и 7-ой дни эксперимента (хроническое внесение). Изменение экспрессии исследуемых генов через 24 ч после последнего внесения детектировали с помощью real-time RT-PCR. Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ.

Результаты. Кортикостерон при хроническом внесении снижает экспрессию нейротрофических факторов BDNF, VEGF и NGF, но при остром внесении повышает экспрессию BDNF и NGF, снижая экспрессию VEGF. Амитриптилин и флуоксетин при хроническом действии в концентрациях выше 10 мкМ снижают жизнеспособность астроцитов. Амитриптилин при хроническом внесении в концентрации 25 мкМ увеличивает экспрессию VEGF, BDNF, NGF, а также глутаминсинтетазы, s100b, серотонинового транспортера и полностью подавляет экспрессию астроцитарного

маркера GFAP. Однократное внесение amitriptyline увеличивает экспрессию VEGF, при этом снижая экспрессию глутаминсинтетазы, NGF и GFAP и серотонинового транспортера. При совместном хроническом внесении с кортикостероном amitriptyline снижает эффекты кортикостерона на уровни экспрессии исследуемых генов.

Выводы. Показано, что в модели хронического стресса *in vitro* amitriptyline увеличивает экспрессию ряда нейротрофических факторов в астроцитах, а при остром стрессе, наоборот, снижает их экспрессию.

Литература

1. Hisaoka-Nakashima, K. et al. (2016) 'Amitriptyline induces brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression through ERK-dependent modulation of multiple BDNF mRNA variants in primary cultured rat cortical astrocytes and microglia', Brain research, 1634, pp. 57-67.

2. Moncrieff, J. et al. (2023) 'The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence', Molecular Psychiatry, 28(8), p. 3243.

ФМ22. Сравнение действия экзогенного анандамида и эффектов ингибирования фермента его деградации в моторных синапсах мышцы

Ю.В. Парщикова (*julia.parschikova@yandex.ru*)¹, Е.О. Тарасова¹

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Анандамид (АЭА) - эндогенный каннабиноид липидной природы, действующий на CB1-рецепторы. В нервно-мышечных синапсах теплокровных животных были описаны ферменты синтеза и деградации АЭА. В синапсах ЦНС ингибирование гидролазы амидов жирных кислот (FAAH), осуществляющей деградацию АЭА, приводит к его накоплению в синаптической щели и проявлению эффектов эндогенно вырабатываемого АЭА. Ранее нами было показано, что экзогенная аппликация АЭА (30 мкМ) приводит к увеличению частоты спонтанной секреции медиатора в моторных синапсах мышцы. Целью исследования стало сравнение эффектов экзогенного АЭА в различных концентрациях с действием ингибитора его фермента деградации URB597 (1 мкМ).

Методы. Объектом исследования являлся изолированный нервно-мышечный препарат диафрагмы мышцы. Регистрировали спонтанные одноквантовые миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) с использованием стандартной микроэлектродной методики отведения биопотенциалов. Статистическую обработку проводили при помощи критериев Стьюдента и Манна-Уитни.

Результаты. Ингибирование FAAH при помощи URB597 приводило к увеличению как частоты, так и амплитуды МПКП в моторных синапсах диафрагмы мышцы. В то же время, действие экзогенного АЭА в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ не вызывало значимого прироста частоты и амплитуды МПКП, а аппликация анандамида в концентрации 30 мкМ, как и ожидалось, приводила к увеличению частоты МПКП, но не амплитуды МПКП. Таким образом, эффекты экзогенного действия АЭА (30 мкМ) и URB597 схожи в плане увеличения частоты спонтанной секреции, но различаются

по влиянию на амплитуду МПКП. Причины таких различий могут быть связаны с накоплением на фоне действия URB597 не только АЭА, но и других эндоканнабидов, в норме подвергающихся гидролизу со стороны FAAH, что требует дополнительной проверки.

Выводы. И на фоне экзогенного действия АЭА (30 мкМ), и на фоне блокады фермента дегградации анандамида FAAH наблюдается прирост частоты МПКП. Кроме того, ингибирование FAAH приводит к увеличению амплитуды МПКП.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ №23-25-00065

ФМ23. Кортикальный ответ бодрствующего животного при различных протоколах сенсорной стимуляции

Е.Р. Першикова (pershikova.er@phystech.edu)¹, А.П. Трифонова^{1,2}, Е.Н. Кислухина², Н.В. Лизунова^{2,3}

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

²Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Россия, Москва

³МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Метод широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН) представляет собой мезоскопию коры больших полушарий (флуоресцентную или при светорассеянии) *in vivo*. Сенсорная стимуляция в лабораторной практике применяется для различных целей: функциональное картирование головного мозга, детекция функциональных нарушений органов чувств, центральной нервной системы, нарушений нейроваскулярного сопряжения. Стимуляция органов чувств животного в бодрствующем состоянии сложна из-за индиви-дуального порога чувствительности и поведенческих реакций, что затрудняет подбор оптимального протокола проведения эксперимента и обнаружение ответа на стимул, но дает качественно иные результаты, чем анализ реакций под наркозом.

Методы. Эксперименты проведены на трансгенных мышцах линии GP5.17 (JAX stock #025393) с экспрессией в нейронах флуоресцентного сенсора Ca²⁺ CaMP6f. Для возможности использования метода ШОН мышам была проведена операция по имплантации краниального окна. Для измерения динамики мозговой активности мышцы использованы параметры: сигнал, обусловленный, GCaMP6f - возбуждение 470 нм, эмиссия 520 нм (20 Гц); сигнал, обусловленный Hb, — светорассеяние 530 нм (10 Гц) и 656 нм (10 Гц).

Результаты. Проведено сравнение следующих протоколов стимуляции: подача стимулов в течение 1, 2 и 4 с, а также пачками по 4 стимула длительностью 200 мс (протокол «пульс»), период во всех экспериментах составлял 20 с. Протестированы различные амплитуды стимулов: 30, 60 и 90 мкА для тактильной стимуляции лап; 50, 100 и 125 мкА для зрительной стимуляции (белый свет); 0,5, 1 и 1,7 л/мин для тактильной стимуляции вибрисс (поток воздуха). Проведен анализ поведенческой реакции: стимуляция вибрисс в 100% случаев вызывала ярко выраженную двигательную реакцию с активацией 80% всей видимой коры больших полушарий; стимуляция конечностей в 27% случаев провоцировала двигательную реакцию, которая приводила к появлению артефактов и затрудняла анализ и интерпретацию результатов. Наиболее амплитудный локальный ответ в кортексе мы наблюдали

при проведении эксперимента на протоколе «пульс». Оптимальная амплитуда стимуляции вибрис 1 л/мин, конечностей - 90 мкА, глаз - 100 мкА.

Выводы. Для анализа нейроваскулярного сопряжения наиболее рационально проведение зрительной стимуляции на протоколе «пульс» с амплитудой стимула 100 мкА.

ФМ24. Изменение активности антиоксидантных систем в печени при содержании крыс с холестазом на рационах с различным режимом ограничения питания

А.С. Петрухина (alepetrukhina@gmail.com)¹, Д.С. Семенович², П.А. Абрамичева², Л.Д. Зорова^{2,3}

¹*Факультет биотехнологии и экологии МГАВМиБ — МВА имени К. И. Скрябина, Россия, Москва*

²*Лаборатория структуры и функции митохондрий НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ, Россия, Москва*

³*ГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова Минздрава России, Россия, Москва*

Введение. Окислительный стресс играет важную роль во многих типах хронического повреждения печени и может быть причиной развития фиброза [1]. Активные формы кислорода и продукты свободнорадикального окисления способствуют активации антиоксидантных систем в печени, что сопровождается активным синтезом компонентов внеклеточного матрикса [2]. Ограничение калорийности питания и интервальное голодание вызывают активное использование энергии АТФ, способствуют регенерации и запуску аутофагии в клетках печени [3].

Методы. Исследования были выполнены на половозрелых самцах крыс линии Вистар. Для моделирования холестаза осуществляли перевязку общего желчного протока. В качестве контрольной группы использовали ложнооперированных животных. После операции животных содержали в течение 1 месяца на одном из 3 рационов с различным режимом ограничения питания: стандартном рационе вивария *ad libitum* (СРВ), интервальном голодании (голод 24 ч через каждые сутки, ИГ) и 35% ограничении калорийности питания (ОКП). В ткани печени оценивали содержание восстановленного глутатиона (GSH), общую активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ) и глутатионпероксидазы (ГПО).

Результаты. В печени крыс с холестазом, содержавшихся на СРВ, наблюдалось 2-кратное снижение содержания GSH, что сопровождалось 1,5-кратным увеличением активности ГПО и более чем 2-кратным снижением активности СОД и КАТ по сравнению с контролем. Содержание животных с холестазом на рационе с ИГ и 35% ОКП не приводило к изменению активности антиоксидантных ферментов по сравнению с СРВ.

Выводы. Содержание животных с холестазом на рационах с различным режимом ограничения питания не приводит к улучшению функционирования антиоксидантных систем в ткани печени из-за развития выраженного окислительного стресса.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 21-75-30009.

Литература

1. Allameh A. et al. (2023) Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease, Antioxidants, 12, № 9, 1653.

2. Sanchez-Valle V. et al. (2012) Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review, *Curr. Med. Chem.*, 19, № 28, 4850-4860.

3. Hafez S., Elbassuoni E. (2022) Dysfunction of aged liver of male albino rats and the effect of intermitted fasting; *Biochemical, histological, and immunohistochemical study*, *Int. Immunopharmacol.*, 103, 108465.

ФМ25. Нейротрофин мозга и его продомен оказывают сходное влияние на спонтанную секрецию медиатора в новообразованных моторных синапсах мыши

Д.А. Потапова (potapovadiana2001@mail.ru)¹, П.О. Богачева¹

¹*Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Протеолиз предшественника нейротрофина мозга (проBDNF) приводит к образованию двух схожих по размеру молекул - BDNF и продомена BDNF. И тогда как эффекты BDNF широко изучены и продолжают изучаться повсеместно, о действии продомена BDNF известно очень мало.

Методы. Эксперименты выполняли на новообразованных в ходе регенерации нерва моторных синапсах m. EDL мыши. Регистрировали одноквантовые миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) при помощи стандартной микроэлектродной методики. Для статистической обработки использовали критерии Стьюдента и Манна-Уитни.

Результаты. В новообразованных моторных синапсах BDNF оказывал положительное влияние на амплитуду МПКП, не затрагивая их частоту и время нарастания. Причиной было увеличение размера кванта медиатора, которое предотвращалось блокатором везикулярного транспортера ацетилхолина везамиколом. Такое потенцирующее действие BDNF было опосредовано активацией TrkB рецепторов, и не проявлялось при использовании блокатора данных рецепторов циклотраксина В.

Продомен BDNF оказывал точно такое же влияние на спонтанную секрецию медиатора, как и BDNF: увеличение амплитуды МПКП без изменения частоты или временных параметров. Эффект продомена так же предотвращался в присутствии везамикола и циклотраксина В. Известно, что при активации TrkB рецепторов возможен запуск сразу нескольких сигнальных каскадов, один из них - MAPK/ERK. При помощи U0126 можно блокировать MEK-киназы, а значит ингибировать сигнальный путь MAPK/ERK на начальных стадиях. Инкубация нервно-мышечного препарата с U0126 предотвращала развитие эффектов и BDNF, и продомена BDNF в отношении спонтанной секреции медиатора, что демонстрирует центральную роль MAPK/ERK-каскада в опосредовании их влияния на амплитуду МПКП.

Выводы. В новообразованных моторных синапсах как зрелый BDNF, так и его продомен способны увеличивать размер кванта медиатора и это обусловлено активацией одних и тех же сигнальных путей.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-25-00073.

ФМ27. Исследование безопасности минерально-органического костного компонента на биологических объектах

Ф.О. Самойленко (teds-workplace@yandex.ru)¹, И.Н. Лемба¹, Е.В. Писарева¹, М.Ю. Власов^{1,2}, В.Е. Редникина¹

¹Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Россия, Самара

²Самарский государственный медицинский университет, Россия, Самара

Введение. Поиск новых безопасных и биосовместимых материалов для профилактики остеорезорбции и лечения других патологий костной ткани в настоящее время является актуальным. Одним из таких материалов является минерально-органический костный компонент (МКК). МКК - это материал, получаемый из костной ткани животных. Имеет химическую формулу $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, и, в отличие от всех известных синтетических кальцийсодержащих материалов, содержит комплекс микроэлементов, которые входят в неорганический компонент костной ткани. Целью нашей работы было исследование безопасности МКК *in vitro* и *in vivo* на клеточной и животной моделях.

Методы. Исследования проводились на следующих биологических объектах: культуры клеток (дермальные фибробласты), крысы, кролики и свиньи. До вовлечения в эксперимент все животные были клинически здоровы. Биохимия и общий анализ крови проводились на последнем этапе на свиньях породы «Ливенская». Животные были разделены на две группы: экспериментальная (внутримышечные инъекции суспензии МКК) и контрольная (инъекции стерильного физиологического раствора). Экспериментальной группе делали две инъекции суспензии МКК в дозировке по 100 мг/кг) с интервалом 14 суток. Взятие венозной крови на общий и биохимический анализы осуществлялось в 1-й (перед Введением препарата), 14-й и 28-й день после введения МКК. На 28-е сутки у выведенных из эксперимента животных делали забор фрагментов органов и тканей на гистологические исследования. Исследовались биохимические показатели: активность щелочной фосфатазы, АЛАТ, АСАТ, ЛДГ, ГГТП, уровень холестерина, триглицеридов, глюкозы, общего белка, С-реактивного белка, кальция, фосфатов, IgE, мочевины, креатинина.

Результаты. При внутримышечном введении МКК опытным животным не выявлено существенных изменений большинства морфологических и биохимических показателей крови. В области инъекции препарата патоморфологические признаки поражения мышечной ткани отсутствовали. Признаки воспаления, а также поражения жизненно важных органов не выявлены. Отложений кальциатов в тканях не обнаружено.

Выводы. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что МКК безопасен и не оказывает токсического действия на биологические объекты.

ФМ28. Влияние нокаута гена *Tnf* на экспрессию BDNF, серотониновую систему мозга и поведение при хронической алкоголизации у мышей

А.К. Скотникова (a.skotnikova@g.nsu.ru)¹, В.С. Москалюк², С.Н. Адонина², У.С. Устинова³, Д.В. Базовкина²

¹Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск

³Новосибирский государственный университет

Введение. Фактор некроза опухоли (TNF) - провоспалительный цитокин и один из ключевых посредников между иммунной и центральной нервной системами. TNF вовлечен в регуляцию поведения, нейротрофического обеспечения мозга и работу серотониновой системы мозга.

Целью данной работы было исследование влияния полного нокаута гена *Tnf* на чувствительность мышей к длительной алкоголизации (10% этанол, 6 недель).

Методы. Эксперименты проводили на половозрелых мышах с нокаутом гена *Tnf* (TNF KO) и мышах инбредной линии C57BL/6 (WT). Уровень экспрессии генов, кодирующих BDNF, его рецепторы и компоненты серотониновой системы в структурах мозга (префронтальная кора, гиппокамп, средний мозг) оценивали методом ОТ-ПЦР реального времени. Уровни белков BDNF и proBDNF оценивали методом Вестерн-блот анализа, а уровни серотонина (5-НТ) и его метаболита 5-Н1АА в структурах мозга исследовали методом ВЭЖХ.

Результаты. Статистический анализ выявил увеличение длительности социальных контактов в тесте «резидент-интродер» и снижение когнитивных способностей в тесте «новый объект» у мышей WT вследствие хронической алкоголизации по сравнению с контрольными животными ($p < 0,05$), но не у мышей линии TNF KO. В тесте «водный лабиринт Морриса» под воздействием этанола наблюдалось ухудшение динамики обучения у мышей обеих линий. При этом длительное потребление этанола не оказало влияния на уровень 5-НТ и его метаболита 5-Н1АА, однако наблюдалось снижение экспрессии гена 5-НТ2А рецептора во фронтальной коре только у мышей WT ($p < 0,05$). Также этанол не оказал влияния на экспрессию гена *Bdnf*, содержание белка BDNF и его предшественника proBDNF у мышей обеих линий в исследованных структурах мозга, однако привел к снижению уровня мРНК гена *Ntrk2* (TrkB рецептор) в гиппокампе только у мышей WT ($p < 0,001$) и уровня мРНК гена *Ngfr* (рецептор p75) во фронтальной коре у мышей нокаутной линии ($p < 0,05$).

Выводы. Полученные данные позволяют расширить представление о влиянии иммунной системы на серотониновую систему и нейротрофическое обеспечение мозга.

ФМ29. Участие гуанилинов и их рецептора GC-C в модификации транспорта солей в кишечнике на фоне высокосолевой диеты самок крыс

Снигирева Е.Д.¹ Шеин В.Е.¹, Балакина Т.А.¹, Смирнова О.В.¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва.

Кишечник, играет важную роль в поддержании осмотического баланса и является первым рубежом на пути поступления электролитов в организм, регулируя их всасывание в кровь с помощью ионных транспортеров, среди которых: NHE2, NHE3, NBCe1 и CFTR. Гормональная регуляция транспорта ионов осуществляется в том числе гуанилинами – натрийуретическими пептидами кишечника, влияющими также на обмен бикарбонатов и хлоридов. Гуанилин и урогуанилин, выделяясь при пероральном потреблении соли, действуют через мембранный рецептор – гуанилатциклазу C, и снижают всасывание ионов и воды кишечником. Гипотеза: гуанилины помимо своего основного функционала могут участвовать в модификациях осмотического баланса в условиях хронически повышенного потребления соли.

Экспериментальные группы самок крыс стока Wistar содержали на высокосолевой диете в течение 2 и 4 недель. Контрольная группа находилась на нормосолевой диете. Каждые 2 недели осуществлялся сбор суточной мочи, по истечении срока диеты производился сбор крови для измерения натрия, и животные подвергались эвтаназии с изъятием фрагментов двенадцатиперстной и толстой кишки для оценки экспрессии гуанилинов, их рецептора, NHE2, NHE3, NBCe1 и CFTR методом ПЦР-РВ.

После 2 недель диеты у крыс наблюдался значимый рост клиренса натрия, а после 4 – снижение, при стабильном уровне натрия в крови. Схожая динамика показана и для количества мРНК транспортеров NHE2 и 3 в двенадцатиперстной кишке на 4 неделе диеты. Изменений мРНК гуанилинов обнаружено не было, однако показано наличие положительных корреляций между уровнями мРНК гуанилатциклазы C и транспортеров группы NHE, а также NBCe1 и CFTR в обоих отделах кишечника. Более того, показана тенденция к снижению уровня мРНК рецептора в двенадцатиперстной кишке к 4 неделе диеты ($p=0,069$). Полученные результаты отражают вовлечение гуанилиновой оси в модификацию осмотического баланса в кишечнике на фоне высокосолевой диеты, причем не на уровне самих пептидов, а за счет изменения экспрессии их рецептора.

ФМ30. Изучение механизмов развития воспаления в динамике при обструктивной нефропатии у крыс

И.А.Соколов (ilya_sokolov11@mail.ru)^{1,2}, П.А.Абрамичева², Д.С.Семенович², Л.Д.Зорова²

¹Кафедра биотехнологии и промышленной экологии, РХТУ им.Д.И.Менделеева, Россия, Москва

²Лаборатория структуры и функции митохондрий, НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ, Россия, Москва

Введение. Острое почечное повреждение (ОПП) характеризуется резкой потерей почками своей функции и может привести к развитию хронической болезни почек (ХБП). Причины данного заболевания различны: ишемия, нефротоксичные препараты, сепсис [1]. При диагностике ОПП анализируют уровень сывороточного

креатинина, содержание IL-18, цистатина С и другие маркеры [2]. Для изучения заболеваний почек используются различные экспериментальные модели, например, модель унилатеральной обструкции мочеточника (УУО) и ее различные модификации. Целью данной работы является оценка динамических изменений маркеров острого почечного повреждения при обструктивной нефропатии в модели обратимой УУО.

Методы. Исследование проводили на самцах крыс линии Вистар, разделенных на следующие экспериментальные группы: интактные, с трехдневной УУО, с обратимой трехдневной УУО (забор материала спустя 1 сутки после снятия обструкции мочеточника) и спустя 3 суток. Животным из группы УУО перевязывали мочеточник, в группах с обратимой УУО пережимали мочеточник с использованием силиконовой трубки. Спустя 3 суток удаляли силиконовую трубку и производили контралатеральную нефрэктомию. После проведенных манипуляций собирали биологический материал: левая почка, кровь, моча. Для оценки функции почки измеряли концентрацию креатинина и мочевины в сыворотке животных. Уровень гладкомышечного альфа-актина в ткани почки был проанализирован с помощью вестерн блоттинга (антитела к α -SMA (ab5694, Abcam, USA) в разведении 1:1000).

Результаты. Во всех группах, где была произведена обструкция, статистически значимо возрастало соотношение массы почки к массе животного. Уровень креатинина и мочевины в сыворотке возрастал во всех группах, при этом наибольшая концентрация данных маркеров была через 1 сутки после снятия обструкции. Уровень α -SMA в почках увеличивается через 3 дня обструкции, резко повышается на 1 сутки после прекращения обструкции, но снижается через 3 дня после УУО.

Выводы. Модель обратимой трехдневной обструкции мочеточника может использоваться для исследования ОПП, так как в ней выявляются признаки развития дисфункции почки. При этом наибольшая выраженность ОПП наблюдается через 1 сутки после прекращения обструкции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-30009).

Литература

1. Yang F. et al. Clinical analysis of cause, treatment and prognosis in acute kidney injury patients // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 2. P. e85214.
2. Bonventre J.V. Diagnosis of acute kidney injury: from classic parameters to new biomarkers // Contrib. Nephrol. karger.com, 2007. Vol. 156. P. 213-219.

ФМ31. Разработка протокола для широкопольной оптической нейровизуализации сенсорной стимуляции наркотизированных мышей, экспрессирующих генетически кодируемый биосенсор GCaMP6f

А.П. Трифонова (*trifonova.ap@phystech.edu*)^{1,2}, Е.Н. Кислухина¹, Н.В. Лизунова^{1,3}, Е.Р. Першикова²

¹ФГАУ “НМИЦ Здоровья детей” Минздрава России, Россия, Москва

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

Введение. Широкопольная оптическая нейровизуализация позволяет одновременно регистрировать изменения динамики электрической активности и гемодинамических событий в большой области коры головного мозга. Данный метод позволяет проводить исследования взаимодействий функциональных областей коры как при моделировании неврологических заболеваний (ишемического инсульта, черепно-мозговой травмы, нарушений циклов сна и бодрствования), так и при наблюдении за активностью здорового мозга. Многие нейробиологические задачи требуют многократной подачи сенсорного стимула, однако это непросто реализовать на бодрствующей мыши. Использование анестезии сопряжено со сложностями детекции ответа в кортексе.

Методы. Исследование проводили на мышах линии C57BL/6J-Tg (Thy1-GCaMP6f) GP5.17Dkim/J (JAX stock #025393), экспрессирующих флуоресцентный Ca²⁺-биосенсор GCaMP6f в нейронах. Грызунам проводили имплантацию краниального окна с истончением костей черепа. Для регистрации флуоресценции использовали возбуждение 470 нм, регистрацию эмиссии на 520 нм. Гемодинамические события регистрировали в режиме светорассеяния на 530 и 656 нм. Унилатеральную тактильную стимуляцию проводили при помощи электростимулятора и имплантированных электродов. В качестве зрительного стимула выступал белый светодиод. Исследования проводили под ингаляционным наркозом (изофлуран 0,5-2%).

Результаты. Мы протестировали различные амплитуды стимулов (60, 90 и 300 мкА для тактильной, 100 и 200 мкА для зрительной стимуляции), а также протоколы непрерывной стимуляции (4 и 2 с) и импульсной (серии из 4 стимулов по 200 мс, 1 Гц). Выявлено, что наркоз позволяет избавиться от артефактов локомоции, но существенно влияет на амплитуду как кальциевого, так и гемодинамического ответа. При достижении хирургической стадии наркоза с отсутствием роговичного и pedalного рефлексов кальциевого ответа в кортексе на стимул нет. При снижении дозы изофлурана ответ регистрируется, однако необходимая амплитуда стимула превышает таковую для бодрствующего животного. Даже при неглубоком наркозе при помощи Фурье-анализа был выявлен пик на 1,3 Гц, соответствующий дельта-волнам на ЭЭГ, который существенно затрудняет детекцию целевого сигнала.

Выводы. Глубина ингаляционного наркоза существенно влияет на возможность регистрации ответов на сенсорные стимулы. Для детекции ответов необходим индивидуальный подбор дозы изофлурана и применение частотной фильтрации для элиминации артефактов дыхания, сердцебиения и дельта-волновой активности.

ФМ32. Эффекты сверхэкспрессии гена 5-НТ7-рецептора во фронтальной коре на поведение и метаболизм серотониновой нейромедиаторной системы у мышей линии C57BL/6 при длительной алкоголизации

М.И. Тубалова (mariaatubalova@gmail.com)^{1,2}, А.С. Орешко², Д.В. Базовкина², В.С. Науменко²

¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, Новосибирск

Введение. Нарушения функций серотониновой (5-НТ) системы мозга могут лежать в патогенезе алкогольной зависимости. Особое внимание привлекает 5-НТ7-рецептор, который участвует как в регуляции активности 5-НТ-системы, так и развитии расстройств поведения.

Методы. Целью было изучение эффектов введения во фронтальную кору мышей линии C57BL/6 вирусного конструкта SynH1-2_HTR7-EGFP, вызывающего сверхэкспрессию гена 5-НТ7-рецептора, на поведение и метаболизм серотонина в мозге при хронической алкоголизации. Влияние сверхэкспрессии оценивали через 5 недель на фоне потребления 10 % этанола (контроль пил воду). Поведение изучали в тестах «открытое поле», «трехкамерный тест», «приподнятый крестообразный лабиринт», «распознавание нового объекта», «принудительное плавание». Содержание 5-НТ и его метаболита оценивали с помощью ВЭЖХ. Экспрессию гена 5-НТ7-рецептора оценивали методом ОТ-ПЦР реального времени. Анализ данных проводили двухфакторным дисперсионным анализом ANOVA с последующим межгрупповым сравнением по Фишеру.

Результаты. У мышей, получивших конструкт с целевым геном, было показано значительное увеличение уровня мРНК гена 5-НТ7 рецептора во фронтальной коре ($p < 0,001$). Исследуемые группы не различались по двигательной активности в тесте «открытое поле». У мышей, получивших конструкт без целевого гена, хроническое потребление алкоголя привело к повышению тревожного поведения в тесте «открытое поле» ($p < 0,01$), индекса социального предпочтения в трехкамерном тесте ($p < 0,05$), и к небольшому снижению показателей памяти в тесте «распознавание нового объекта» ($p = 0,07$). При этом сверхэкспрессия гена 5-НТ7-рецептора обусловила снижение тревожного поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» у мышей, потреблявших воду ($p < 0,05$), но не этанол ($p > 0,05$). Различий между группами в тесте «принудительное плавание» не было. Хроническая алкоголизация привела к увеличению содержания 5-НТ в гипоталамусе у мышей, получивших конструкт как с целевым геном ($p < 0,05$), так и без него ($p < 0,001$). Сверхэкспрессия гена 5-НТ7-рецептора привела к повышению уровня 5-НТ во фронтальной коре только у мышей, пивших этанол ($p < 0,001$).

Выводы. Таким образом, сверхэкспрессия гена 5-НТ7-рецептора во фронтальной коре модулирует эффекты хронической алкоголизации на поведение и содержание 5-НТ в структурах мозга.

ФМ33. HER2-специфичные липосомы, нагруженные белковой BRET-парой, для таргетной самоактивируемой фотодинамической терапии

В.П. Филимонова (alicekitova@yandex.ru)¹, Г.М. Прошкина¹, Е.И. Шрамова¹, С.М. Деев¹

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

Введение. Фотодинамическая терапия (ФДТ) - способ лечения раковых опухолей путём возбуждения фотосенсибилизатора (ФС) светом с определённой длиной волны с последующей генерацией активных форм кислорода (АФК), приводящих к гибели клетки. Главным минусом ФДТ является малая проникающая способность света в биологические ткани, поэтому на данный момент она используется только для лечения неглубоко расположенных опухолей. Целью нашей работы было преодолеть это ограничение путём создания белковой пары, состоящей из продуцирующего АФК SOPP3 и люциферазы NanoLuc, с которой при добавлении её субстрата фуримазина происходит биолюминесцентный ре-зонансный перенос энергии на SOPP3.

Методы. Получили генно-инженерную конструкцию NanoLuc-SOPP3. Белок экспрессировали методом автоиндукции, очищали методом металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Определяли величину BRET путём измерения люминесценции NanoLuc-SOPP3 после добавления фуримазина. Липосомы с NanoLuc-SOPP3 получали методом замораживания/ оттаивания и экструдирования, их размер оценивали на Zetasizer Nano ZS, структуру - с помощью крио-ЭМ. Адресные липосомы получали путём конъюгации с DARPin₉₋₂₉, цитотоксичность определяли с помощью МТТ-теста, взаимодействие с HER2 рецептором проверяли на проточном цитометре, интернализацию - на конфокальном микроскопе. Уровень АФК измеряли с помощью CellROX Deep Red Reagent. Для исследований *in vivo* использовали мышей с подкожной аденокарциномой или с внутрибрюшинной опухолью SKOV3ip-Kat.

Результаты. В ходе работы создали эффективную BRET пару (эффективность переноса энергии составила 1,12). Полученный препарат загружался в липосомы за счёт электростатических взаимодействий, размер протеолипосом составил 85.34 ± 0.81 нм. Было показано специфическое взаимодействие препарата с HER2+ клетками, с его последующей интернализацией и гибелью клеток; эффект на HER2-клетках был незначительным. При исследованиях *in vivo* наблюдалось накопление препарата в опухоли, коэффициент ингибирования роста опухоли составил 78%.

Выводы.

Доказали, что гибридный белок NanoLuc-SOPP3 является BRET-парой. Эффективность переноса энергии - 1,12.

Доказали селективное цитотоксическое действие липосомальной формы NanoLuc-SOPP3 на HER2⁺-клетки при BRET-индуцированной и фотоиндуцированной ФДТ с IC₅₀ 262,2 и 111,5 нМ соответственно.

Показали накопление адресных липосом с NanoLuc-SOPP3 в опухоли *in vivo* и их ингибирующее действие на рост опухоли, TGI 78,38%.

На модели внутрибрюшинной опухоли SKOV3ip-Kat показали большую эффективность BRET-индуцированной ФДТ по сравнению с фотоиндуцированной.

ФМ34. Исследование апоптоза и цитотоксичности репрограммированных CD8+T-лимфоцитов костного мозга и селезёнки мышей в культуре клеток карциномы лёгкого Льюис

А.А. Фоминых (*anton.fominykh.02@mail.ru*)^{1,2}, Н.Н. Ермакова^{1,3}, Е.Ю. Федоруцева²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Россия, Москва

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия, Томск

³Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» Томского НИМЦ, Россия, Томск

Введение. Нарушение апоптоза - один из механизмов ускользания раковых клеток от программируемого разрушения. Наиболее мощными эффекторными клетками противоопухолевого иммунного ответа являются цитотоксические CD8+T-лимфоциты. В ходе образования опухоли снижается активность метаболических путей CD8+T-лимфоцитов и формируется их гипореактивность. Путём изменения внутриклеточного метаболизма иммунных клеток можно стимулировать повышение эффективности противоопухолевого ответа. Это делает подход модификации сигнальных путей CD8+T-лимфоцитов перспективным подходом борьбы с раком легкого.

Методы. В ходе эксперимента из костного мозга бедренных костей и селезёнки мышей линии C57BL/6 были получены наивные CD8+T-лимфоциты. Часть CD8+T-лимфоцитов подвергалась репрограммированию ингибитором сигнального пути MEK и ингибитором PD-1, а также «обучению» посредством взаимодействия с антигенпрезентирующей смесью опухолевых клеток. Другая часть наивных CD8+T-лимфоцитов выступала в качестве контроля. В культуре клеток аденокарциномы лёгкого Льюис изучались апоптоз и цитотоксичность наивных и репрограммированных CD8+T-лимфоцитов селезенки и костного мозга.

Результаты. Репрограммированные CD8+T-лимфоциты костного мозга и селезёнки обладают более высоким цитотоксическим эффектом и меньшей апоптотической гибелью в сравнении с наивными CD8+T-лимфоцитами. Цитотоксический эффект CD8+T-лимфоцитов костного мозга и селезёнки всех клеточных популяций различий не имел, также как и апоптотическая устойчивость до истощения. После проведения истощения апоптотическая устойчивость обученных истощённых CD8+T-лимфоцитов селезёнки была выше, чем у костного мозга в наибольших соотношениях опухолевых клеток к CD8+T-лимфоцитам.

Выводы. Ингибирование сигнальных путей MAPK/ERK и PD-1/PD-L1 является новым подходом увеличения устойчивости CD8+T-лимфоцитов селезенки и костного мозга к ингибирующему действию опухолевых клеток и повышению специфической противоопухолевой активности.

ФМ35. Исследование влияния цитизина и варениклина как агонистов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР) на реперфузионное повреждение сердца

И.В. Холошенко (innakholos5@gmail.com)^{1,2}, Е.А. Гондаренко², М.С. Северюхина³, А.М. Исмаилова⁴, И.В. Шелухина²

¹*Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Россия, Москва*

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

³*Пуцинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Россия, Пуццо*

⁴*Лаборатория биологических испытаний, филиал Института биоорганической химии им. Шемякина-Овчинникова РАН, Россия, Пуццо*

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из основных причин смерти в мире, среди которых лидирует ишемическая болезнь сердца (ИБС). Имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на то, что активация никотиновых ацетилхолиновых рецепторов может уменьшить повреждение сердца в результате ишемии и последующей реперфузии.

Методы. Крысам с моделью острого инфаркта миокарда вводили за 5 минут до окклюзии левой коронарной артерии через катетер в яремной вене антитабачные препараты цитизин и варениклин, которые взаимодействуют с несколькими подтипами нейрональных нАХР. Тотальную РНК экстрагировали из ткани трех областей левого желудочка сердца крыс: зоны инфаркта (ЗИ), зоны риска (ЗР) и нормальной (Н) ткани для контрольной группы и групп, получавших препараты. Далее проводили количественное определение уровня экспрессии мРНК для субъединиц нАХР, генов апоптоза BCL2, CASP-3, BAX и гена домашнего хозяйства GADPH методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. В полученных образцах были обнаружены субъединицы $\alpha 4$, $\alpha 6$ и $\beta 2$, для которых наблюдались изменения уровня экспрессии мРНК. Имеется тенденция к увеличению экспрессии мРНК субъединицы $\alpha 4$ в ЗР и ЗИ. Для BAX имеется тенденция к снижению мРНК при обработке варениклином и цитизином, тогда как для BCL2 тенденция к увеличению экспрессии мРНК в ЗР и ЗИ после обработки препаратами.

Выводы. Поскольку уровни мРНК проапоптотического BAX имели тенденцию к снижению, а антиапоптотического BCL2 - к увеличению в группах, получавших препараты, можно предположить защитное действие этих агонистов на кардиомиоциты. Как отмечалось ранее, активация нАХР при ишемическом повреждении ограничивает размер инфаркта, а агонисты нАХР можно использовать в качестве кардиопротекторов. Наши данные показывают, что цитизин и варениклин, в число мишеней которых входят $\alpha 4\beta 2$ нАХР, уменьшают реперфузионное повреждение сердца на крысиной модели ишемии миокарда. Эти соединения, являющиеся лекарственными средствами, широко применяются для лечения никотиновой зависимости и могут быть предварительно рекомендованы в качестве кардиопротекторов.

ФМ36. Аспекты эндогенного действия эндоканнабиноидов в нервно- мышечных моторных синапсах

К.А. Чернышев (*cherkir2000@yandex.ru*)¹, П.О. Богачева¹

¹Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. Эндоканнабиноиды (ЭК), высвобождаясь из мышц и действуя ретроградно на нервные терминалы моторных синапсов, разнообразно модулируют нервно-мышечную передачу. В этой работе мы задались вопросом схожести синаптических эффектов 2-арахидоноилглицерола (2-АГ) и арахидоноилэтаноламида (АЭА), вырабатываемых естественным путем и добавленных *in vitro*.

Методы. При помощи стандартного микроэлектродного метода регистрировали миниатюрные одноквантовые и вызванные стимуляцией нерва многоквантовые потенциалы концевой пластинки (МПКП и ПКП). Эксперименты проводились на моторных синапсах *m*.EDL мышцы.

Результаты. В функционально зрелых синапсах применение экзогенного 2-АГ (1 мкМ) увеличивало амплитуду ПКП. Это происходило за счет увеличения размера кванта медиатора. Применение экзогенного АЭА (10 мкМ) также увеличивало амплитуду ПКП, но не за счет увеличения размера кванта медиатора, а за счет повышения количества секретируемых квантов. Для изучения влияния естественно синтезируемых ЭК мы применяли ингибиторы ферментов их деградации. Так, при применении ингибитора деградации 2-АГ, JZL-184 (1 мкМ), наблюдали полное повторение эффектов экзогенного 2-АГ: увеличение амплитуды ПКП без изменения квантового состава, что говорит о возможности синтеза и высвобождения эндогенного 2-АГ при залповой активности нервно-мышечных синапсов. В аналогичном эксперименте, применяя ингибитор деградации АЭА, URB-597 (1 мкМ), ожидаемый прирост амплитуды нами обнаружен не был. Это может говорить о недостаточном уровне выработки эндогенного АЭА при стандартном режиме работы зрелых моторных синапсов. В дополнение к предыдущим сериям мы также изучили влияние ингибитора фермента синтеза 2-АГ, DO34 (1 мкМ), на активность нервно-мышечного синапса. Изменение амплитуды ПКП в этом случае не наблюдали.

Выводы. Таким образом, нам удалось расширить понимание эффектов ЭК, синтезируемых в мышце естественным путем, а также сравнить эффекты эндогенно синтезируемых и экзогенно внесенных ЭК.

Работа поддержана грантом РФФ 23-25-00065.

ФМ37. Действие экотоксиканта 3-метилфенантрена на возбудимость желудочковых миоцитов наваги (*Eleginus nawaga*)

А.В. Шамшура (a_shamshura1801@mail.ru)¹, Д.В. Абрамочкин¹

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

Введение. 3-метилфенантрен (ЗМФ) является одним из наиболее распространенных полиароматических углеводородов в составе нефти. Он обладает значительной растворимостью в воде и изменяет электрическую активность сердца рыб (в том числе северной наваги, *Eleginus nawaga*). Цель: проанализировать действие ЗМФ на возбудимость желудочковых миоцитов и изучить влияние комбинированного воздействия нескольких стрессорных факторов (повышенная температура и гиперкалиемия) в сочетании с ПАУ на электрическую активность сердца наваги.

Методы. Желудочковые кардиомиоциты *Eleginus nawaga* выделяли с помощью энзиматической обработки миокарда. Для записи потенциалов действия (ПД) использовали методику пэтч-кламп в конфигурации whole-cell в режиме поддержания тока. Регистрировали ПД при изменяющихся значениях инъецируемого тока. Пороговый ток определяли как минимальный ток, приводящий к генерации ПД. Эксперимент проводили при различных температурах (9°C, 21°C), различных концентрациях ионов калия (3.5мМ, 8мМ), а также в присутствии 3мкМ ЗМФ. Для статистической обработки использовали двухфакторный ANOVA с апостериорным критерием Даннетта.

Результаты. 3мкМ ЗМФ приводит к уменьшению скорости деполяризации при 9°C (от 11.2±2.3В/с до 5.1±0.72В/с), и в условиях гиперкалиемии (от 3.74±0.5В/с до 2.74±0.36В/с, при 9°C). Не наблюдается значимого влияния ЗМФ на скорость деполяризации при температуре 21оС. Пороговый ток увеличивался под действием 3мкМ ЗМФ при 9°C (от 0.95±0.08нА до 1.1±0.08нА) и в условиях гиперкалиемии (от 1.25±0.07нА до 1.35±0.08нА, при 9°C), и не изменялся при 21°C. ЗМФ в условиях гиперкалиемии и высокой температуры (21°C) приводил к увеличению порога (от 1.15±0.1нА до 1.28±0.1нА), и уменьшению скорости деполяризации (от 7.3±1.9В/с до 3.5±0.63В/с).

Выводы. Таким образом, эффекты ЗМФ сильнее всего выражены при нормальной температуре (9°C) по сравнению с экстремальной (21°C). На фоне сочетанного действия высокой температуры и гиперкалиемии ЗМФ приводит к увеличению порога возбудимости и уменьшению скорости деполяризации.

ФМ38. Вклад продуцируемых NADPH-оксидазами АФК в регуляцию сократительных ответов артерий крыс в периоде раннего постнатального онтогенеза увеличивается после неонатальной гипоксии

В.С. Шатеева (shateevav@mail.ru)¹, Д.К. Гайнуллина¹, С.Д. Симоненко¹, М.А. Хлыстова¹, А.А. Швецова¹

¹*Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Введение. Согласно данным ВОЗ, неонатальная асфиксия и сопровождающая ее гипоксия являются ведущими причинами смертности среди младенцев. Известно, что гипоксия может приводить как к «острым», так и к «отставленным» изменениям регуляции тонуса сосудов. Важную роль в изменении сосудистых реакции под действием гипоксии играют активные формы кислорода (АФК), в том числе продуцируемые NADPH-оксидазами (NOX). Целью нашей работы стало оценить «отставленные» эффекты кратковременной неонатальной нормо-барической гипоксии на вклад АФК, продуцируемых NOX, в регуляцию тонуса подкожной артерии крысят в период раннего постнатального онтогенеза.

Методы. В работе моделировали неонатальную нормобарическую гипоксию (8% O₂ в течение 2 часов) у крысят в возрасте 2 дня (группа «Гипоксия»). Крысят группы «Контроль» на 2 часа помещали в аналогичные условия, но с нормальным содержанием O₂ (21%). Оценку «отставленных» эффектов гипоксии проводили на потомстве в возрасте 11-15 дней. Оценивали содержание основных биохимических параметров сыворотки крови, содержание белка каталитических субъединиц NOX в ткани подкожной артерии, а также сравнивали функциональный вклад АФК, продуцируемых NOX, в регуляцию сократительных ответов артерий на агонист а 1-адренорецепторов метоксамин и агонист рецепторов тромбосана A2 U46619 с использованием ингибитора VAS2870 в системе wire myograph.

Результаты. Основные биохимические показатели сыворотки крови, (АЛТ, АСТ, общий белок, альбумин, глобулины и мочевины), а также содержание белка каталитических субъединиц NOX2 и NOX4 в ткани подкожной артерии крысят групп «Контроль» и «Гипоксия» не различались. Ингибитор NOX VAS2870 (10 мкМ) в равной степени снижал сократительные ответы артерий на метоксамин у крысят группы «Контроль» и «Гипоксия»: площадь под кривой после инкубации с VAS2870 составила 63±9 % от кривой с растворителем в группе «Контроль» и 62±6 % в группе «Гипоксия» (p>0.05, непарный t-тест). Сократительные ответы на другой вазоконстриктор U46619 также существенно ослаблялись после инкубации с VAS2870, однако этот эффект был выражен больше в сосудах крысят группы «Гипоксия». Площадь под кривой после инкубации составила 86±6 % от кривой с растворителем в группе «Контроль» и 58±9 % в группе «Гипоксия», (p<0.05, непарный t-тест).

Выводы. Таким образом, мы показали, что неонатальная гипоксия приводит к увеличению проконстрикторного вклада продуцируемых NOX АФК в регуляцию сократительных ответов подкожной артерии, вызванных агонистом рецепторов тромбосана A2 U46619, но не агонистом а 1-адренорецепторов ме- токсamiном. Изучение механизмов, лежащих в основе выявленных различий, является предметом будущих исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда № 23-25-00056.

ФМ39. Влияние хронического ингибирования пируватдегидрогеназы на регуляцию цикла трикарбоновых кислот и ацилирование белков мозга

И.С. Карлина (aniram0107@mail.ru)¹, А.В. Казанцев², А.В. Граф^{3,4}, В.И. Буник^{4,5}

¹*Сеченовский университет, Россия, Москва*

²*Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

³*Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

⁴*НИИ ФХБ МГУ им. А.Н. Белозерского, Россия, Москва*

⁵*Факультет биоинформатики и биоинженерии МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК) катализирует важную для энергетического обмена реакцию образования ацетил-КоА - субстрата цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и реакций ацетилирования белков.

Цель работы: определить сопряжение между хроническим ингибированием ПДГ мозга, регуляцией лимитирующей скорость ЦТК 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (ОГДК) и физиологическими параметрами животных.

Методы. Крысам ежедневно в течение 30 дней капали в нос ингибитор ПДГ – структурный аналог пирувата ацетил (метил) фосфинат (AcMeP) в дозах 0,01 и 0,02 ммоль/кг – суммарно 0,3 и 0,6 ммоль/кг. На 31-й день проводили физиологическое тестирование с последующей декапитацией и извлечением коры мозга. Замороженную ткань гомогенизировали в буфере, содержащем ингибиторы протеаз, фосфатаз и деацилаз. В гомогенатах измеряли активность ОГДК и уровень ацилирования белков.

Результаты. Введение 0,3 ммоль/кг AcMeP увеличивало активность эндогенного холофермента ОГДК и уровень ацетилирования белков 10 кДа, но снижало уровень сукцинирования белков 22 и 27 кДа. За исключением сукцинирования белков 22 и 27 кДа, параметры возвращались к исходному уровню при введении 0,6 ммоль/кг AcMeP; одновременно возрастал уровень сукцинирования белков 10-16 кДа. Ингибировании ПДГ изменяло соотношения между эндогенным холоферментом и общим уровнем ОГДК или активацией ОГДК ТДФ, что устраняло присущие контролю корреляции ацетилирования белков 52 кДа с теми же параметрами и соотношения между приростом веса и потреблением еды. Ингибирование ПДГ существенно меняло и характерные для контроля соотношения ацилирования белков мозга с параметрами ЭКГ и поведения.

Выводы. Хроническое ингибирование ПДГ повышает скорость лимитирующей стадии ЦТК за счет активации ОГДГ эндогенным ТДФ и сопряжено с изменениями ацилирования гистоновых и негистоновых белков. Такие изменения могут поддерживать адаптации к ингибированию, в том числе на уровне поведения и ЭКГ.

Гостема АААА-А19-119042590056-2

Секция «Биотехнология»

Б1. Подбор растворителя для экстракции пигментов: фикоцианина, аллофикоцианина и фикоэритрина из микроводоросли *Porphyridium sp. Näg.*

Ю-Д.С. Бойченко (*danaja01@mail.ru*)¹, Е.А. Буденкова¹

¹Лаборатория микробиологии и биотехнологий, Высшая школа живых систем, БФУ имени И. Канта, Россия, Калининград

Введение. Микроводоросли *Porphyridium* – эффективные производители пигментов, которые применяют в качестве натуральных косметических и пищевых красителей, и в качестве флуоресцентных зондов [1]. Пигменты *Porphyridium sp.* в большей части представляют собой фикобилипротеины, которые по спектру поглощения света разделяют на четыре класса: фикоэритрин (розово-красный, 490 – 570 нм), фикоцианин (синий, 610 – 625 нм), аллофикоцианин (синезеленый, 650 – 660 нм) [1,2]. Целью работы являлся подбор эффективного экстрактанта для каждого пигмента микроводоросли.

Методы. В работе использовали микроводоросль *Porphyridium sp. Näg.* P-519 из коллекции микроводорослей ИФР РАН. Для культивирования использовали питательную среду Brody & Emerson max. Пигменты экстрагировали с помощью экстрагирующих растворов: метанол, раствор Рингера, цитратный буфер и Tris-HCl, как описано у [2]. Поглощение экстрактов спектрофотометрически измеряли при длинах волн: 560, 565, 620 нм. Концентрацию фикобилипротеинов в экстрактах рассчитывали через уравнения, как описано у [3].

Результаты. Эксперимент, проведенный в рамках данной работы показал, что при равных объемах биомассы, которая использовалась для получения пигментов, эффективность экстракции различна для каждого растворителя. Так, наиболее эффективным экстрактантом для фикоэритрина является цитратный буфер – 0,685±0,050 г/г, для фикоцианина – метанол (0,957±0,092 г/г), для аллофикоцианина – раствор Рингера (0,611±0,029 г/г).

Выводы. В ходе работы было выявлено, что наиболее эффективным экстрактантом для фикоцианина является метанол, для аллофикоцианина – раствор Рингера, фикоэритрина – цитратный буфер. Преобладающим пигментом в клетках *Porphyridium sp. Näg.* является фикоцианин (0,96±0,09 г/г в метаноле).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации соглашения №075-152022-245 (вн. № 13.2251.21.0134)

Литература

1. Tsvetanova, F., Yankov, D. (2022) Bioactive Compounds from Red Microalgae with Therapeutic and Nutritional Value, *Microorganisms*, 10, 2290.
2. Barone, M.E., Herbert, H., Mc Donnell, A., Fierli, D., Fleming, G.T.A., Touzet, N. (2022) Modulation of the metabolite content of the unicellular rhodophyte *Porphyridium purpureum* using a 2-stage cultivation approach and chemical stressors, *Journal of Biotechnology*, 360, 125–132.
3. Pena-Medina, R.L., Fimbres-Olivarria, D., Enríquez-Ocana, L.F., Martínez-Córdova, L.R., Del-Toro-Sánchez, C.L., López-Elias, J.A., González-Vega, R.I. (2023) Erythroprotective Potential of Phycobiliproteins Extracted from *Porphyridium cruentum*, *Metabolites*, 13, 366.

Б2. Создание диагностической платформы для выявления мутаций вируса гриппа на основе технологии CRISPR-Cas

А.А. Горьковская (alexgorkovskaya@mail.ru)¹, А.А. Васильева², Н.Е. Морозова², А.Н. Арсениев², М.А. Ходорковский²

¹Университет ИТМО, Россия, Санкт-Петербург

²СПбПУ Петра Великого, Россия, Санкт-Петербург

Введение. Ежегодно в мире регистрируется около 1 млрд случаев респираторных заболеваний, вызванных вирусами гриппа. Одним из методов лечения являются противовирусные препараты. Однако некоторые штаммы могут приобрести устойчивость к ним благодаря различным мутациям. Классические методы диагностики мутаций дорогостоящие, недостаточно точные, требуют больших временных затрат. Данные проблемы может решить диагностическая платформа, использующая нуклеазы CRISPR-Cas. Cas-нуклеазы вносят двуцепочечные разрывы в конкретные мишени, расположенные вблизи специфичного PAM-мотива. В разрабатываемой платформе нуклеаза будет распознавать целевой участок кДНК вируса гриппа и вносить в него разрыв в зависимости от наличия мутации. В данном исследовании была рассмотрена мутация H275Y в гене нейраминидазы (NA), вызывающая устойчивость к препарату осельтамивир.

Методы. Мутация H275Y происходит за счет замены С на Т в первой позиции триплета. Соответственно, Cas-нуклеаза диагностической платформы должна быть чувствительна к заменам С (или G на комплементарной цепи) в области PAM-мотива. На основании анализа PAM-мотивов известных Cas-нуклеаз была отобрана нуклеаза CcCas9, распознающая мотив 5'-NNNNGNA-3'. Далее было проанализировано окружение H275Y: из базы данных GISAD были получены все доступные последовательности гена NA 81 185 изолятов гриппа; из них были выделены потенциальные мишени для нуклеазы CcCas9 и посчитана частота встречаемости каждой мишени. Из коллекции НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева была получена РНК изолятов с первым и третьим по частоте встречаемости вариантами мишени. Из каждой пробы РНК были синтезированы фрагменты кДНК, содержащие мишени CcCas9. Для каждого варианта мишени была синтезирована специфичная crРНК. Полученные фрагменты ДНК и crРНК были использованы в реакциях расщепления нуклеазой CcCas9.

Результаты. При взаимодействии нуклеазы с последовательностями дикого типа обеих мишеней наблюдалось их эффективное расщепление. Расщепления последовательностей, несущих мутацию, практически не наблюдалось. Дополнительно была проверена возможность перекрестного использования crРНК для разных вариантов гриппа (crРНК1 для мишени 3 и наоборот): результаты оказались сходными с полученными при использовании специфичной crРНК для каждой мишени. Однако эффективность расщепления целевого фрагмента значительно снизилась.

Выводы. Была показана возможность использования нуклеазы CcCas9 для диагностики мутации H275Y в гене NA вируса гриппа H1N1. Были подобраны направляющие crРНК для различных вариантов гриппа. В дальнейшем необходимо осуществить подбор более универсальной последовательности crРНК, обеспечивающей эффективное расщепление целевой последовательности ДНК для различных вариантов гриппа H1N1 или подобрать эффективно работающую смесь различных вариантов crРНК.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (No FSEG-2023-0014)

Б3. Создание аллостерически регулируемой на уровне направляющей РНК CRISPR/Cas9 системы

О.А. Должикова (o.dolzhikova@g.nsu.ru)^{1,2}, М.И. Мещанинова¹, Д.С. Новопашина^{1,2}

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

²Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

Введение. Система геномного редактирования CRISPR/Cas9 в настоящее время широко используется для решения разнообразных молекулярно-биологических и генно-инженерных задач. Усовершенствование этого инструмента в плане точности и эффективности работы является актуальной научной проблемой. Одним из подходов к ее решению является создание аллостерически регулируемых систем CRISPR/Cas9. Целью работы является создание систем CRISPR/Cas9, теofilлин-регулируемых на уровне направляющей РНК.

Методы. Направляющие РНК были получены методом твердофазного фосфитамидного синтеза. Активность CRISPR/Cas9 систем тестировали при расщеплении модельной плазмиды pBS2SKM.

Результаты. Нами были сконструированы направляющие РНК (crРНК, tracrРНК и sgРНК), содержащие нуклеотидную последовательность аптамера к теofilлину в составе взаимодействующих с белком шпилек (верхний стебель, связующая петля, 3'-концевые шпильки), а также на 3'- или 5'-концах. В отсутствие теofilлина дополнительно введенный фрагмент в составе шпилек в большинстве вариантов должен затруднять взаимодействие направляющей РНК с белком. После связывания с теofilлином аптамер приобретает компактную третичную структуру, и активность системы должна возрастать. В случае введения аптамера по концам направляющей РНК в отсутствие теofilлина должен формироваться дуплекс с одним из структурных элементов направляющей РНК (спейсер, верхний стебель или связующая петля), препятствующий корректному взаимодействию РНК-белок. Связывание аптамера с теofilлином в этом случае должно способствовать высвобождению структурных элементов направляющей РНК, важных для образования рибонуклеопротеинового комплекса.

Нами была синтезирована серия сконструированных по описанным выше принципам направляющих РНК и исследована активность CRISPR/Cas9 систем с их участием в присутствии и в отсутствие теofilлина.

Выводы. Созданы аптамерсодержащие направляющие РНК и продемонстрирована возможность аллостерической регуляции активности CRISPR/Cas9 систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-14-00294.

Б4. Замена нативных сигнальных пептидов бета-цепей гликопротеиновых гормонов на сигнальный пептид человеческого сывороточного альбумина приводит к повышению титра гетеродимерных гормонов в культуральной среде

Д.Э. Колесов (52ru111@mail.ru)¹, М.В. Синегубова¹, И.И. Воробьев¹, Н.А. Орлова¹

¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, Москва

Введение. Одним из наиболее экономичных способов повышения секреции рекомбинантных белков является подбор таких сигнальных пептидов (СП), которые позволяют максимизировать перенос полипептидных цепей в эндоплазматический ретикулум клетки-продуцента. При экспрессии мкАт в клетках СНО было показано, что замена нативных сигнальных пептидов на гетерологичные приводила к значительному повышению удельной продуктивности клеток [1][2]. В случае гетеродимерных гликопротеиновых гормонов человека: тиреотропного (ТТГ), фолликулостимулирующего (ФСГ), лютеинизирующего (ЛГ) и хорионического гонадотропина (ХГч) наблюдается преимущественная секреция клетками-продуцентами α -цепи, одинаковой для всех гормонов. Мы предположили, что неоптимальные последовательности сигнальных пептидов β -цепей могут быть частью природного механизма контроля уровня биосинтеза данных гормонов.

Методы. Для каждого из 4 гормонов было получено 4 генетических конструкции, отличавшихся только сигнальным пептидом β -цепи (СП человеческого сывороточного альбумина, азуроцидина, общей для семейства α -цепи и контрольный нативный СП индивидуальной для каждого гормона β -цепи). Была использована такая схема экспрессионной конструкции, в которой открытые рамки считывания α -цепи, β -цепи, и селекционного маркера дигидрофолатредуктазы были разделены внутренними сайтами связывания рибосом вируса энцефаломиокардита.

Результаты. Исследуемыми плазмидами трансфицировали клетки СНО, и после 1 раунда геномной амплификации определяли содержание гетеродимера и свободных цепей в культуральной среде при помощи ИФА и вестерн-блоттинга. Для ЛГ, ХГч и ТТГ наиболее значимое увеличение удельной продуктивности клеток по гетеродимеру наблюдали при использовании сигнального пептида человеческого сывороточного альбумина (в 2, 2.5 и 8 раз соответственно по сравнению с контрольными нативными сигнальными пептидами).

Выводы. Полученные результаты демонстрируют, что для каждого из четырех гормонов можно добиться увеличения титра гетеродимера при повышении эффективности транслокации в ЭР β -субъединиц гормонов за счёт замены нативных сигнальных пептидов на гетерологичные.

Литература

1. Kober L., Zehle C., Bode J. Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines // *Biotechnol. Bioeng.* John Wiley & Sons, Ltd, 2013. Vol. 110, № 4. P. 1164–1173.
2. Park J.H. et al. Development of an in vitro screening system for synthetic signal peptide in mammalian cell-based protein production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Appl Microbiol Biotechnol, 2022. Vol. 106, № 9–10. P. 3571–3582.

Б5. Комбинированное действие наносистемы с иммобилизованным рецептор-специфичным цитокином TRAIL DR5-В и инкапсулированным бортезомибом на клетках глиобластомы

Е.В. Куковьякина (kev0700@yandex.ru)¹, А.Н. Кусков¹, М.Э. Гаспарян^{1,2}, А.В. Яголович^{2,3}

¹*Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Россия, Москва*

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

³*Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

Введение. Модифицированный цитокин TRAIL DR5-В обладает высокой цитотоксичностью на DR5-позитивных опухолях. Благодаря селективному связыванию с рецептором смерти DR5, он также является перспективным лигандом для опухоле-специфичного нацеливания наночастиц, в частности, наночастиц на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона с инкапсулированным бортезомибом (PVP-В).

Методы. Наночастицы PVP-В были получены эмульсионным методом с последующей отгонкой растворителя под вакуумом. Цитокин DR5-В получали в виде рекомбинантного белка путем экспрессии в штамме *E. coli SHuffle B* с последующей очисткой и металл-аффинной и ионообменной хроматографией. Ковалентная конъюгация наночастиц с лигандом DR5-В проводилась путем кликхимии. Цитотоксичность определяли методом МТТ.

Результаты. Полученные комбинированные наночастицы PVP-В-DR5-В обладали сорбционной емкостью не менее 4,5 мг DR5-В на 1 г частиц. Они показали повышенную цитотоксичность на клетках глиобластомы человека U87 и T98G в сравнении как со свободным лигандом DR5-В, так и с не модифицированными частицами PVP-В. При этом они проявили низкую токсичность на нормальных фибробластах huFb.

Выводы. Лиганд DR5-В, иммобилизованный на поверхности частиц PVP-В, выступает как таргетный агент для нацеливания на опухолевые клетки. Кроме того, он проявляет собственную противоопухолевую активность, которая усиливается за счет синергичного эффекта с бортезомибом. Полученная комбинированная наносистема PVP-В-DR5-В имеет перспективы в качестве нового противоопухолевого агента.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №23-15-00468.

Б6. Делеция гена элонгационного фактора Р (EF-R) золотистого стафилококка методом гомологичной рекомбинации.

А.Д. Кутьменева (alya.kutmeneva@mail.ru)¹, Ш.З. Валидов²

¹*Институт фундаментальной медицины и биологии КФУ, Россия, Казань*

²*Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических технологий ФИЦ КазНЦ РАН, Россия, Казань*

Введение. Одним из самых опасных бактериальных патогенов, имеющих высокую скорость приобретения антибиотикорезистентности, является грамположительная бактерия *Staphylococcus aureus*. Золотистый стафилококк вызывает набор серьезных заболеваний и особо опасен как возбудитель внутрибольничных инфекций. *S. aureus*

секретирует набор экзопротеинов, в том числе протеаз, которые позволяют ему избежать атаки иммунной системы организма-хозяина. Для успешной борьбы с этим патогеном необходимо подробное изучение аппарата белкового синтеза бактерии – важной мишени антибактериальных препаратов. Белок EF-P – фактор элонгации, который иницирует образование первой пептидной связи и облегчает синтез «жестких» полипролиновых мотивов, также необходимым для эффективного синтеза белков, важных для жизнедеятельности золотистого стафилококка.

Методы. Для выяснения роли белка EF-P в секреторной функции у штамма *S. aureus* RN4220 методом гомологичной рекомбинации была произведена делеция гена *efp*. Для этого в вектор pKOR1 была осуществлена вставка двух «фланков» – нуклеотидных последовательностей размером 1 кБ, в геноме примыкающих к гену с обеих сторон. После успешной электропорации и наращивании бактериальной массы, клетки растили при 43[U+2103], чтобы избавиться от клеток с плазмидой, которая разрушается при воздействии высоких температур. В дальнейшем к клеткам добавляли ангидротетрациклин, который в плазмиде pKOR1 запускает синтез антисенс-РНК – таким образом производилась селекция клеток, в которых плазида в любом виде отсутствует. На последнем этапе производился поиск колоний с прошедшей рекомбинацией с помощью ПЦР.

Результаты. В результате делеции выяснилось, что рост делеционного мутанта в первые 11 часов отставал от такового у исходного штамма и при разведении в среде хлорамфеникола угнетение роста мутанта происходило интенсивнее. При посеве Defr мутанта с делетированным геном на среду с казеином молока, он показал полное отсутствие протеазной активности по сравнению с диким типом. При анализе секретируемых во внешнюю среду белков было показано снижение концентрации экзопротеинов, а в случае отдельных белков полное их отсутствие у делеционного мутанта. Выделение внеклеточных белков производилось методом концентрирования среды, после ее отделения от культуры, с помощью фильтра с отсечкой 10 кДа (Millipore, Germany).

Выводы. Учитывая важную роль EF-P в жизнедеятельности *S. aureus*, этот белок является многообещающей и селективной мишенью для нового поколения антистафилококковых препаратов.

Б7. Технология повышения биосовместимости разрабатываемого коллагенового раневого покрытия, модифицированного сшивающими агентами с сохранением устойчивости к биодеградации

Е. С. Лапина (lapina.es@edu.spbstu.ru)^{1,2}, Д. А. Соловьёв^{1,2}, Е. Н. Осяева^{1,3}, Э. И. Александер-Синклер¹

¹Институт Цитологии Российской Академии наук, Россия, Санкт-Петербург

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

³Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург,

Введение. Эквивалент Дermalный (ЭД), разработанный в ИнЦ РАН, является тканеинженерным раневым покрытием (РП), состоящим из фибробластов дермы человека (ДФ) и коллагенового гидрогеля, которое успешно применяется для лечения кожных ран. Вместе с тем, это РП обладает определенными недостатками, среди которых высокая скорость биодеградации, сложность нанесения на рану и адгезия к

перевязочным материалам. Один из способов компенсации этих свойств - создание вторичного коллагенового РП, модифицированного сшивающими агентами (СА), такими как рибофлавин, галловая кислота, 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC) совместно с N-Гидрокси-сукцинимидом (NHS), которые успешно создают поперечные химические связи между коллагеновыми фибриллами.

Однако, остаточные концентрации СА могут повлиять на биосовместимость вторичного РП с ЭД, поэтому их вымывание является важным этапом в процессе приготовления РП. В то же время этот процесс, может повлиять на итоговое сшивающее действие. Целью данной работы было определение оптимальных параметров вымывания СА из коллагенового РП для его наибольшей биосовместимости с сохранением устойчивости к биодеградации.

Методы. Коллагеновые РП после сшивания отмывали в дистиллированной воде или фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 20 минут, 3 часов или 1 суток. О биосовместимости отмытых РП с ЭД судили по влиянию на жизнеспособность ДФ человека, культивируемых в модельных средах на основе вытяжек из РП, используя методы световой микроскопии и МТТ-тест. О степени биодеградации отмытых РП судили по концентрации коллагена, вышедшего в раствор после воздействия на них коллагеназы при температуре 37 градусов по Цельсию в течение часа.

Результаты. Результаты исследования показали, что оптимальными параметрами отмывания является вымывание в растворе PBS не менее 3 часов. Было выявлено прослеживается уменьшение степени биодеградации при увеличении времени вымывания СА.

Выводы. Вымывание остаточных концентраций СА из коллагенового РП необходимо проводить в растворе PBS в течение 3 часов и более, при чем этот процесс не оказывает негативного действия на итоговое сшивающее действие СА.

Б8. Разработка технологии получения биомассы культур клеток и органов (адвентивные корни) Маакки амурской

А.С. Нагаева (nasty-a-nagaewa24@mail.ru)¹, М.В. Тимова², О.Н. Прудникова²

¹*Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва*

²*Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Россия, Москва*

Введение. *Maackia amurensis* – древесное лекарственное растение, широко используемое в косметологии и медицине [1]. Показано, что препараты, полученные из ядровой древесины этого вида, обладают гепатопротекторной, антиоксидантной, противоопухолевой, антитромбоцитарной активностью. В связи с возрастающими запросами на сырье *M. amurensis* разработка альтернативных биотехнологических подходов для получения ее биомассы весьма актуальна. Целью данной работы было охарактеризовать по ростовым, цитологическим, характеристикам 4 линии суспензионных культур клеток и 1 линию адвентивных корней *M. amurensis*.

Методы. Суспензионные культуры клеток получали из каллусов стеблевого и листового происхождения, для выращивания использовали питательную среду с минеральной основой по Гамборгу с добавлением фитогормонов 2,4-Д, кинетина и НУК, а также среду с минеральной основой по Шенку и Хильдебрандту (SH) с

добавлением 2,4-Д и кинетина. Адвентивные корни получали из каллусов листового происхождения, для выращивания использовали среду SH с добавлением ИМК.

Результаты. Необходимо отметить, что для данного вида культура адвентивных корней была получена впервые. Показано, что для всех исследованных линий характерны достаточно высокие и стабильные показатели роста, причем показатели адвентивных корней были сопоставимы либо превосходили таковые, полученные для суспензий (продуктивность по биомассе составляла 0,270,3 г*л⁻¹*сут и 0,16–0,23 г*л⁻¹*сут соответственно). Для суспензионных линий также показана значительная степень гетерогенности популяций по размеру агрегатов и морфологии клеток. Проведено выращивание адвентивных корней *M. amurensis* в барботажных 20 л биореакторах в периодическом режиме с сохранением продуктивности. На данный момент проводятся работы по подбору условий пробоподготовки для проведения дальнейшего химического анализа.

Выводы. Таким образом, исследованные штаммы являются перспективными объектами для дальнейшей разработки биотехнологии промышленного получения клеточной биомассы *M. amurensis*.

Литература

FEDOREYEV S.A. and all MEDICINES BASED ON THE FAR EASTERN PLANT MAACKIA AMURENSIS POLYPHENOLS. Health. Medical ecology. The science. 2018 № 1(73) pp35-39.

Б9. Разработка технологии выделения и характеристика бактериоцина штамма *Bacillus subtilis* 2895/6/14

А.А. Нерсисян (*nersisyan.lina@yandex.ru*)¹

¹МИРЭА - Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва

Введение. *Bacillus subtilis* – грамположительная палочковидная бактерия, производящая более двух десятков антимикробных веществ (АМВ), большинство из которых имеют пептидную природу. Бактериоцины – группа синтезируемых на рибосомах пептидов, способных убивать генетически близкие штаммам-продуцентам микроорганизмы. По сравнению с традиционными антибиотиками или пищевыми консервантами бактериоцины не токсичны для человеческого организма, поскольку наши клетки не имеют рецептора, распознаваемого бактериоцинами. Бактериоцины, образуемые *Bacillus spp.*, демонстрируют более широкий антимикробный спектр, чем большинство бактериоцинов молочнокислых бактерий.

В исследовании использовали штамм *Bacillus subtilis* 2895/6/14. В данной работе целевым продуктом является антибиотик, поскольку эксперименты, проводимые во время первичного скрининга, оценивались по зоне подавления роста тест-микроорганизма *Staphylococcus aureus* штамма 209p. *Staphylococcus aureus* – это грамположительная бактерия, которая является возбудителем большого числа заболеваний. Большую угрозу представляют штаммы MRSA, которые имеют резистентность к большому числу антибиотиков.

Методы. Для поверхностного культивирования использовали агаровую среду ISP №4 (солевой агар с крахмалом). Для глубинного культивирования использовали эту же среду без агара. Глубинное культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера на качалке. Культуральную жидкость *B. subtilis* разделяли центрифугированием,

а супернатант концентрировали в 5–10 раз упариванием под вакуумом на ротационном испарителе. Далее сконцентрированный супернатант смешивали с н-бутанолом (1/4 часть от объема), после чего ждали разделения фаз. Отбирали верхний прозрачный слой желтоватого цвета, содержащий биологически активный материал в бутанольной фракции, и высушивали до полного удаления растворителя. Дальнейший анализ антибиотиков проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе растворителей хлороформ:метанол:вода (3:2:0,5) с последующей биоавтографией.

Результаты. 1) Исследуемый штамм проявляет антагонистическую активность. 2) Методика выделения позволяет получить активную фракцию, которая подавляет рост *Staphylococcus aureus*. 3) Оптимальным временем культивирования на среде ISP-4 являются 4 дня.

Выводы. Мы провели скрининг штамма *Bacillus subtilis*, культивируемого на различных питательных средах, и оценили методику выделения целевого продукта из жидкой питательной среды.

Мы выяснили, что исследуемый штамм производит антибиотик, ингибирующий рост золотистого стафилококка, и оптимизировали условия культивирования для максимального выхода продукта.

Б10. Полиэлектролитные наночастицы на основе пектина и хитозана для доставки лекарств против глиобластомы

Ф.О. Трухин (fedortruhin2940@gmail.com)¹, А.А. Патлай¹, А.С. Белоусов¹, В.В. Кумейко^{1,2}, В.Е. Силантьев^{1,3}

¹Дальневосточный федеральный университет, Институт наук о жизни и биомедицины (школы), Посёлок Аякс, 10 к М, Владивосток 690022, Россия

²ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» ДВО РАН, 690041, Россия, г. Владивосток, ул. Пальцевого, 17

³Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук, проспект 100-летия Владивостока, 159, Владивосток 690022, Россия

Введение. Терапия опухолей головного мозга проводится с использованием химио- и радиотерапии, которые имеют много побочных эффектов. Для их снижения можно использовать метод доставки лекарств непосредственно к опухолям. При этом именно наночастицы с размерами до 200 нм и положительным зарядом способны проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [1]. Целью работы была создание полиэлектролитных наноразмерных комплексов для доставки лекарств против опухолей головного мозга. Были использованы противоположно заряженные полисахариды – хитозан и пектин. Оба полисахарида являются нетоксичными, биосовместимыми и биоразлагаемыми [2].

Методы. Наночастицы сформированы методом ионного гелирования. Морфология наночастиц охарактеризована просвечивающей электронной и атомносиловой микроскопией. Были оценены их механические свойства, размер и поверхностный заряд. Структурные особенности наночастиц охарактеризованы ИК спектроскопией. Эффективность адсорбции и десорбции химиопрепарата ломустина исследованы ультрафиолетовой (УФ) спектрофотометрией. Цитотоксичность на опухолевых

клетках линии U87-MG исследована методом МТТ теста.

Результаты. Наночастицы от 30 до 250 нм имели эллипсоидную и сферическую форму. Дзета-потенциал наночастиц составлял от -39 до 74 мВ, адгезия от -5,7 до -1,1 пН. Увеличение концентрации хитозана увеличивало эти показатели и повышало сферичность наночастиц. Модуль Юнга наночастиц варьировался от 0,8 до 5,8 Мпа и возрастал с увеличением концентрации пектина. Эффективность сорбции ломустина составляла 81–98%, десорбции – 9–91%, оба параметра зависели от соотношения полимеров. Большинство наночастиц без лекарства не влияли на метаболическую активность опухолевых клеток.

Выводы.

Полученные материалы могут представлять практический интерес использования в качестве доставщиков лекарственных средств в головной мозг, в том числе в терапии онкологических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (соглашение № 22-73-10172 от 29.07.2022 г.)

Литература

1. Silant'ev V.E. How to Develop Drug Delivery System Based on Carbohydrate Nanoparticles Targeted to Brain Tumors / Silant'ev V.E., Shmelev M.E., Belousov A.S., et.al. – Polymers, 2023 – p. 1-7
2. Ahmed O. Taurine loaded chitosan-pectin nanoparticle shows curative effect against acetic acid-induced colitis in rats / Ahmed O., Abdel-Halim M., Farid A., Elamir A. – Chemico-Biological Interactions, 2022 – p. 8-10

Б11. Получение пектиновых наночастиц и изучение их влияния на клетки глиобластомы человека U87MG

Р.А. Шатилов (shatilov.ra@dvfu.ru)¹, В.Е. Силантьев^{1,2}, М.Е. Шмельёв¹, А.С. Белоусов¹, В.В. Кумейко^{1,3}

¹Дальневосточный федеральный университет, Школа медицины и наук о жизни, Россия, Владивосток

²Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Россия, Владивосток

³ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» ДВО РАН, Россия, Владивосток

Введение. Для лечения опухолей головного мозга проблема терапии до сих пор актуальна по ряду причин: селективный гематоэнцефалический барьер, большая общая токсичность применяемых химиопрепаратов, невозможность улучшения эффективности радиотерапии и полной резекции опухоли. Поэтому последние 30 лет рассматривают варианты упаковки химиопрепаратов в доставщики (носители) нанометрового размера.

Достоинство подобного подхода в том, что препарат иммобилизуется на носителе и не влияет на нецелевые клетки и ткани.

Выбор пектина в качестве носителя обусловлен несколькими факторами: доступность, изученность и применение в области пищевой промышленности (в т. ч. в лечебно-профилактическом, радиозащитном питании).

Методы. Низкоэтерифицированный пектин со степенями этерификации 0% и 50% и ионы кальция (в составе CaCl_2) были использованы для синтеза наночастиц путём ионотропного гелеобразования. Атомно-силовая микроскопия была использована для визуализации и оценки частиц, МТТ-тест использовали для оценки метаболической активности клеток, платформу для непрерывного мониторинга живых клеток Cell-IQ использовали для оценки влияния на морфологию и пролиферацию клеток.

Результаты. Таким образом, удалось синтезировать наночастицы различного размера (до 200 нм) и провести тесты на метаболическую активность и пролиферацию клеток глиобластомы человека в присутствии пектиновых наночастиц с различной степенью этерификации. Выявили, что пектиновые наночастицы не оказывают влияния на опухолевые клетки.

Выводы. Сами по себе пектиновые наночастицы не цитотоксичны, вероятно, на нормальные клетки мозга они также не будут оказывать цитотоксическое действие. Т.е. терапевтический эффект должен быть только за счёт загруженного химиопрепарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-73-10172

Содержание

ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ	4
Секция «Доклады»	7
Д1. Молекулярные механизмы биотрансформации и токсикодинамики противовирусного препарата “Рибавирин”	7
Д2. Нейротоксические эффекты цинка при глаукоме: роль фактора пигментного эпителия сетчатки	8
Д3. Влияние регуляторных факторов стресса на чувствительность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани к норадреналину.....	9
Д4. Опухоль-инфильтрирующие В-лимфоциты как резервуар для поиска опухоли-специфичных антител	10
Секция «Биохимия»	11
БХ1. Посттрансляционное ацетилирование фактора транскрипции E2F1 в нейронах перифокальной области фототромботического инфаркта	11
БХ2. Селективность липид-связывающих сайтов температурноактивируемых ионных каналов TRPV1 и TRPV3.....	11
БХ3. Промотор гена FOS обладает чувствительностью к одновалентным катионам.....	12
БХ4. Исследование локализации ДГОК в ядре и митохондриях методами масс-спектрометрии и иммуноблоттинга.....	13
БХ5. Изменения метаболизма клеток глиобластомы человека при инфекции онколитическим вирусом полиомиелита	14
БХ6. Исследование регуляции АТФазной активности FOF1-АТФ-синтазы <i>Bacillus subtilis</i> .15	
БХ7. Увеличение внутриклеточного содержания Li ⁺ влияет на экспрессию генов и сигнальные каскады в клетках эндотелия	16
БХ8. Получение рекомбинантного α -синуклеина человека в бактериальной системе экспрессии.....	17
БХ9. Механизм влияния химических шаперонов аргинина и лизина на тепловую агрегацию бычьего сывороточного альбумина	18
БХ10. Получение и структурно-функциональная характеристика гиспидин-3-гидроксилазы из <i>Armillaria ostoyae</i>	19
БХ11. Экспрессия и ацетилирование фактора транскрипции c-Myc в нервных клетках после фототромботического инсульта	19
БХ12. Структурные и функциональные свойства немышечных изоформ тропомиозина Trpm1.8 и Trpm1.9.....	20
БХ13. Влияние кардиотонических стероидов на вызванное бета-амилоидом увеличение активности Src-киназы и изменение уровня APP в клетках нейробластомы SH-SY5Y.....	21
БХ14. Разнообразие форм гомологов каротиноидсвязывающего белка ASTAR.....	22
БХ15. Получение рекомбинантного одноцепочечного варибельного фрагмента ингибиторного антитела к RAPP-A и исследование его иммунохимических свойств	23
БХ16. Изучение динамики экспрессии Т-кадгерина в процессе адипогенной дифференцировки	24
БХ17. Изменение уровня экспрессии гена GAD1 глутаматдекарбоксилазы в листьях кукурузы в условиях гипоксического стресса.....	25
БХ18. Получение рекомбинантной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы человека в бактериальной системе экспрессии, определение ее удельной активности и температуры	

плавления	26
БХ19. TolC-содержащие помпы множественной лекарственной устойчивости влияют на МИК антибиотиков, используемых в ветеринарии	27
БХ20. Использование метода гель-хроматографии для определения молекулярной массы нативных молекул изоформ γ - гидроксibuтиратдегидрогеназы из проростков кукурузы (<i>Zea mays</i> L.)	28
БХ21. Влияние различных типов мембранотропных веществ для определения активности Na ⁺ /K ⁺ -АТФазы в грубой микросомально-митохондриальной фракции коры больших полушарий головного мозга крыс	29
БХ22. In silico мутагенез терминальной дезоксинуклеотидилтрансфераз человека	30
БХ23. Влияние цинка на структуру фактора пигментного эпителия сетчатки	31
Секция «Молекулярная и клеточная биология»	33
МБ1. Роль р53-зависимого сигналинга в устойчивости клеточной линии А549 к митотическим ингибиторам	33
МБ2. Додецил-содержащие производные олигонуклеотидов: особенности самосборки и нековалентных взаимодействий с сывороточным альбумином человека	34
МБ3. Мезильная модификация увеличивает стабильность малых интерферирующих РНК без потери их биологической активности	35
МБ4. Рецептор эстрогенов α – потенциальная мишень новых изокриптолепинов	36
МБ5. Изучение редокс статуса и активности антиоксидантных систем стволовых клеток глиобластом с различной чувствительностью к химиотерапии	37
МБ7. Исследование свойств химерных белков, состоящих из тропонина С и сердечной изоформы тропонина I или ее фрагмента	38
МБ8. Фотопереключаемое расщепление ДНК нуклеазой Cas9 с использованием азобензол-модифицированных аналогов направляющих РНК	39
МБ9. Исследование группы транскрипционных факторов в процессах дифференциации тканей кишечника на свободноживущем плоском черве <i>Macrostomum lignano</i>	40
МБ10. Активность 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз <i>Escherichia coli</i> и человека на коротких петлях ДНК	41
МБ11. Исследование роста нейроподобных клеток на скаффолдах из поли3-оксибутирата с магнитоактивными наноматериалами	42
МБ14. Возможная связь моноамин-индуцированной гетерологической сенситизации мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с клеточными циркадными ритмами	45
МБ15. Роль р53 в чувствительности shh-медуллобластомы к иксабепилону и эрибулину	46
МБ16. Изучение влияния паратиреоидного гормона на дифференцировочный потенциал культуры мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в условиях неконтактного сокультивирования	47
МБ17. Участие компонентов piРНК системы — Vasa и Rhino — в поддержании ранних герминальных клеток в сперматогенезе <i>Drosophila melanogaster</i>	48
МБ18. Роль экспрессии генов, кодирующих факторы агрегации, в механизме гистосовместимости у <i>Halisarca dujardini</i>	49
МБ19. Генетическая и антигенная характеристика ускользящих мутантов вируса гриппа А/Н7N9	50
МБ20. Подбор методов иммортализации первичных клеток почки обыкновенных игрунок (<i>Callithrix jacchus</i>)	51

МБ21. Подбор способа созревания кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека, для получения релевантной клеточной модели кардиомиопатии	52
МБ22. Морфофункциональные различия CD14 ⁺ и CD16 ⁺ субпопуляций моноцитарных макрофагов	53
МБ23. Изучение тимусной селекции при помощи анализа данных секвенирования репертуара T-клеточных рецепторов	54
МБ24. Биологические свойства вакцинных кандидатов на основе ЖГВ подтипа H1N1pdm09	55
МБ25. Изучение влияния микроокружения на регенеративную способность мезенхимных стромальных клеток	56
МБ27. Поиск новых генов опсинов у двустворчатых моллюсков	58
МБ28. T-кадгерин как негативный регулятор адипогенеза	59
МБ29. Исследование взаимодействия hsa-miR-101 и кластера miR 371~373	60
МБ30. Нокаут гена UBE2A связан со снижением экспрессии генов комплекса немышечного миозина в нейрональных клеткахпредшественниках, дифференцированных из ИПСК ...	60
МБ31. Разработка низкомолекулярных ингибиторов Р-гликопротеина на основе пентациклических тритерпеноидов для терапии опухолей с фенотипом множественной лекарственной устойчивости	61
МБ32. Роль компонентов опухолевого внеклеточного матрикса в регуляции эндотелиально-мезенхимного перехода в клетках эндотелия in vitro	62
МБ33. Создание иммортализованной линии мезенхимальных стромальных клеток эндометрия человека и ее модификация с помощью лентивирусной трансдукции	63
МБ34. Изменение активности генов Tlr4 и IL1 β при воздействии этанола на культуру клеток SH-SY5Y и фармакологическая коррекция рифампицином	64
МБ35. Моделирование болезни Гентингтона путем создания изогенных клеточных линий SHSY5Y с индуцибельной экспрессией участка гена HTT, содержащего CAG-повторы разной длины	65
МБ36. Исследование окислительного стресса клеток кожи в условиях 2D И 3D культивирования	66
МБ37. Особенности транскрипции спермоспецифичной глицеральдегид-3фосфатдегидрогеназы в меланоме	67
МБ38. Модифицированные фоторасщепляемые направляющие РНК для создания регулируемой системы CRISPR/Cas9	68
МБ39. Усовершенствованный васкуляризованный дермальный эквивалент, как терапия ран и модель кожи человека	69
МБ40. Омиксные подходы к изучению молекулярных особенностей ферроптоза	70
МБ41. Сравнительная эффективность методов диагностики мутаций гена KRAS при колоректальном раке	71
МБ42. Характер влияния малой некодирующей 6S-1 РНК на синтез сурфактина в клетках Bacillus Subtilis	72
МБ43. Сравнение систем и условий получения псевдовирусных частиц хантавирусов	73
МБ44. Транскриптомное профилирование автономных морфогенетических свойств мезенхимальных стромальных клеток кожи и эндометрия человека	74
МБ45. Поиск потенциальных генов-мишеней для новых подходов в терапии глиобластом с помощью РНК-интерференции	75
МБ46. Анализ экспрессии гена FLNC в клеточной модели FLNC ассоциированной рестриктивной кардиомиопатии	76

МБ47. Функционирование ГАМК-трансаминазы в листьях <i>Zea mays</i> L. при засолении	77
МБ48. Получение фибробластоподобных производных ИПСК с нокаутом генов, кодирующих основные активирующие НК-клеточные лиганды	78
МБ49. Анализ взаимодействия FXR1 с белками стресс-гранул в дрожжевой модельной системе	79
МБ50. Репортерные конструкции для оценки формирования Гквадруплексных структур <i>in vivo</i>	80
МБ51. Разработка метода детекции трехмерных контактов плазмидной ДНК с хроматином в клетках НЕК293Т	81
МБ52. Роль стохастических процессов в колебаниях концентрации кальция в тромбоцитах	82
МБ53. Влияние поли(АДФ-рибоза)полимеразы-1 на взаимодействие dCas-белков с нуклеосомами	83
Секция «Физиология и медицинская биохимия»	84
ФМ1. Применение низкотемпературной гелиевой плазмы для исследования антиоксидантных свойств лекарственных препаратов на культуре клеток <i>Paramecium caudatum</i>	84
ФМ2. Активация механизма аутофагии в ткани мозга крыс перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию	85
ФМ3. Роль системы фосфорилирования пируватдегидрогеназы в адаптациях к нарушениям тиамин-зависимого метаболизма	86
ФМ4. Влияние блокады глюкокортикоидных рецепторов на поведение и структуру гиппокампа у самцов крыс, перенесших фокальную ишемию мозга	87
ФМ5. Эффекты вещества BGP-15 на функции митохондрий и массу скелетной мышцы при длительном снижении сократительной активности	88
ФМ7. Особенности поведения мышей с нарушенной передачей сигнала через TNFR2	90
ФМ9. Значение липидного микроокружения в бета2-адренергической регуляции нервно-мышечной передачи	91
ФМ10. Изменение экспрессии цитокинов в лимбической системе головного мозга крыс при воздействии алкоголя	92
ФМ11. Уровень белков плотных контактов в эндотелиях сосудов головного мозга мышей mdx	93
ФМ12. Быстрая оценка эффективности действия антибактериальных препаратов разных классов и их композиций с использованием биолюминесцентной тест-системы на основе живых клеток <i>E. coli</i>	94
ФМ13. Новые производные изоалантолактона как платформа для создания препаратов против опухолей молочной железы и ингибиторов агрессивного фенотипа клеток мультиформной глиобластомы	95
ФМ14. Физиологическое типирование линий мышей, нокаутных по генам PARK2, α , β , γ синуклеинов	96
ФМ15. Иммунный оксистерин как мышечный протектор в условиях митохондриальной дисфункции	97
ФМ16. Экспрессия микро-РНК miR-9-3p и miR-132 в гиппокампе мышей линии C57Bl/6 при хронической зависимости от морфина	98
ФМ17. Животная модель контролируемого повреждения роговицы для полуколичественной оценки его исходов	99
ФМ18. Использование метаболитов и биомаркеров для диагностики послеоперационного	

менингита у пациентов нейрохирургического профиля.....	100
ФМ19. Продуцируемые NADPH-оксидазами АФК способствуют сокращению системных, но не легочных артерий крыс	101
ФМ20. Исследование маточного цикла <i>Acomys sahirinus</i> как перспективного объекта для выяснения механизмов обновления эндометрия	102
ФМ21. Влияние антидепрессантов на вызванные кортикостероном изменения экспрессии нейротрофических факторов в астроцитах крысы <i>in vitro</i>	103
ФМ22. Сравнение действия экзогенного анандамида и эффектов ингибирования фермента его деградации в моторных синапсах мыши	104
ФМ23. Кортикальный ответ бодрствующего животного при различных протоколах сенсорной стимуляции	105
ФМ24. Изменение активности антиоксидантных систем в печени при содержании крыс с холестазом на рационах с различным режимом ограничения питания	106
ФМ25. Нейротрофин мозга и его продомен оказывают сходное влияние на спонтанную секрецию медиатора в новообразованных моторных синапсах мыши	107
ФМ27. Исследование безопасности минерально-органического костного компонента на биологических объектах	108
ФМ28. Влияние нокаута гена <i>Tnf</i> на экспрессию <i>BDNF</i> , серотониновую систему мозга и поведение при хронической алкоголизации у мышей	109
ФМ29. Участие гуанилинов и их рецептора GC-C в модификации транспорта солей в кишечнике на фоне высокосолевого диеты самок крыс	110
ФМ30. Изучение механизмов развития воспаления в динамике при обструктивной нефропатии у крыс	110
ФМ31. Разработка протокола для широкопольной оптической нейровизуализации сенсорной стимуляции наркотизированных мышей, экспрессирующих генетически кодируемый биосенсор <i>GCaMP6f</i>	112
ФМ32. Эффекты сверхэкспрессии гена 5-HT7-рецептора во фронтальной коре на поведение и метаболизм серотониновой нейромедиаторной системы у мышей линии <i>C57BL/6</i> при длительной алкоголизации	113
ФМ33. HER2-специфичные липосомы, загруженные белковой BRET-парой, для таргетной самоактивируемой фотодинамической терапии	114
ФМ34. Исследование апоптоза и цитотоксичности репрограммированных CD8+T-лимфоцитов костного мозга и селезёнки мышей в культуре клеток карциномы лёгкого Льюис	115
ФМ35. Исследование влияния цитизина и варениклина как агонистов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) на реперфузионное повреждение сердца	116
ФМ36. Аспекты эндогенного действия эндоканнабиноидов в нервно- мышечных моторных синапсах.....	117
ФМ37. Действие экотоксиканта 3-метилфенантрена на возбудимость желудочковых миоцитов наваги (<i>Eleginus nawaga</i>).....	118
ФМ38. Вклад продуцируемых NADPH-оксидазами АФК в регуляцию сократительных ответов артерий крыс в периоде раннего постнатального онтогенеза увеличивается после неонатальной гипоксии	119
ФМ39. Влияние хронического ингибирования пируватдегидрогеназы на регуляцию цикла трикарбоновых кислот и ацилирование белков мозга	120
Секция «Биотехнология»	121
Б1. Подбор растворителя для экстракции пигментов: фикоцианина, аллофикоцианина и	

фикоэритрина из микроводоросли <i>Porphyridium</i> sp. Näg.....	121
Б2. Создание диагностической платформы для выявления мутаций вируса гриппа на основе технологии CRISPR-Cas	122
Б3. Создание аллостерически регулируемой на уровне направляющей РНК CRISPR/Cas9 системы.....	123
Б4. Замена нативных сигнальных пептидов бета-цепей гликопротеиновых гормонов на сигнальный пептид человеческого сывороточного альбумина приводит к повышению титра гетеродимерных гормонов в культуральной среде	124
Б5. Комбинированное действие наносистемы с иммобилизованным рецептор-специфичным цитокином TRAIL DR5-B и инкапсулированным бортезомибом на клетках глиобластомы	125
Б6. Делеция гена элонгационного фактора Р (EF-P) золотистого стафилококка методом гомологичной рекомбинации.	125
Б7. Технология повышения биосовместимости разрабатываемого коллагенового раневого покрытия, модифицированного сшивающими агентами с сохранением устойчивости к биodeградации	126
Б8. Разработка технологии получения биомассы культур клеток и органов (адвентивные корни) Маакии амурской.....	127
Б9. Разработка технологии выделения и характеристика бактериоцина штамма <i>Bacillus subtilis</i> 2895/6/14.....	128
Б10. Полиэлектrolитные наночастицы на основе пектина и хитозана для доставки лекарств против глиобластомы.....	129
Б11. Получение пектиновых наночастиц и изучение их влияния на клетки глиобластомы человека U87MG	130