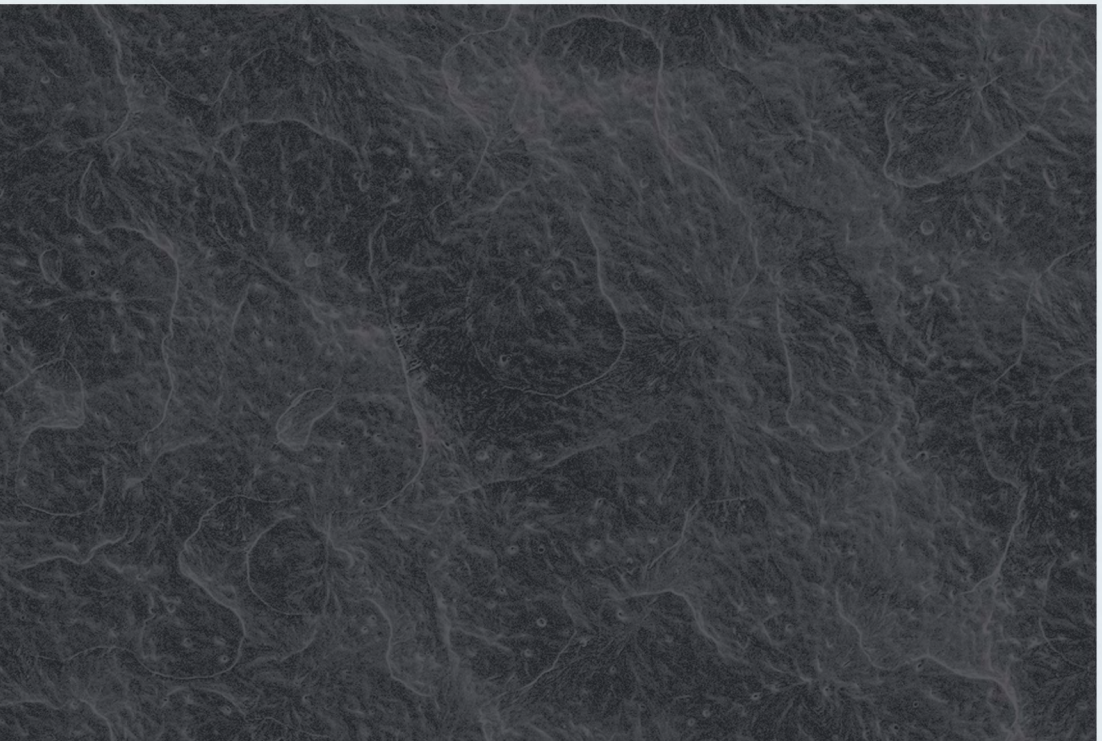
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РАН

X МОЛОДЕЖНАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

СБОРНИК ТЕЗИСОВ
ШКОЛЫ-КОНФЕРЕНЦИИ ДЛЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН

12–16 ОКТЯБРЯ 2026 ГОДА
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ



X МОЛОДЕЖНАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

2026

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

X МОЛОДЕЖНАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

Сборник тезисов
Школы-конференции для молодых ученых
Института цитологии РАН

12–16 октября 2026 года

Санкт-Петербург

ПОЛИТЕХ-ПРЕСС
Санкт-Петербургский
политехнический университет
Петра Великого

Санкт-Петербург
2026

ББК 28.05
Д37

Р е ц е н з е н т ы:
Доктор биологических наук, профессор Российской академии наук,
заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов
Института цитологии Российской академии наук
Н. А. Барлев
Доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией клеточных биотехнологий
Центра клеточных технологий Института цитологии Российской академии наук
Н. А. Михайлова

X Молодежная Школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии : сборник тезисов Школы-конференции для молодых ученых Института цитологии РАН, 12–16 октября 2026 г., Санкт-Петербург. – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2026. – 448 с.

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ:
Председатель
ТОМИЛИН А. Н., член-кор. РАН
Заместитель председателя
МАЛАШИЧЕВА А. Б., д.б.н.

БЕРДИЕВА М. А., к.б.н.
ГУЖОВА И. В., д.б.н.
КОРНИЛОВА Е. С., д.б.н.
МИХАЙЛОВА Н. А., д.б.н
ЛЮБЛИНСКАЯ О. Г., к.ф.-м.н.
ЕНУКАШВИЛИ Н. И., к.б.н.
ОСТРОУМОВА О. С., д.б.н.

ОРГКОМИТЕТ:
Председатель
МОРШНЕВА А. В., к.б.н.
Заместитель председателя
ГНЕННАЯ Ю. А.

АЛХАСАН Б., к.б.н.
БЕЛЯЕВА А. А.
ГНЕДИНА О. О., к.б.н.
ГУРЬЕВ Н. А.
ДОКШИН П. М., к.б.н.
ДУТЫШЕВА Е. А., к.б.н.
ЗЛОДЕЕВА П. Д.
ИШМАНОВ Т. Ф.
КАРПОВА Н. Д.
КРАСКОВСКАЯ Н. А., к.б.н.
КУНЕЕВ И. К.
ЛИТВИНОВ И. К.
МАРТЫНЮК В. А.
МАРЧЕНКО Д. М.
МИКЕЛАДЗЕ М. А., к.б.н.
НЕВЗОРОВ И. А.
ПАЛИЙ О. С.
ПОЗДНЯКОВ Д. Ю.
РУДНЕВА З. М.
САФОНОВ П. Ю., к.б.н.
СЕМЕНОВ О. М.
СЕРДЮКОВА Д. А., к.б.н.
СМИРНОВА Д. В.
ТИШКОВА М. В.
ФАТЫЙХОВ И. Р.
ФЕФИЛОВА Е. А.
ЧАБИНА А. С.
ШЕКУНОВ Е. В., к.б.н.

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ:
БРК № 075-15-2025-482
ООО «ЛМК»
АО «Биохиммак»
ООО «Профилаб»
ООО «Скайджин»
ООО «Люмипроб РУС»
ООО «БМТ»
ООО «Диаэм»
ООО «АртБиоТех»
ООО «Лакопа»
ООО «Вермес»

© Институт цитологии
Российской академии наук, 2026
© Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого, 2026

ISBN 978-5-7422-9638-6
doi:10.18720/SPBPU/2/id26-563

Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

INSTITUTE OF CYTOLOGY OF
THE RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

X YOUTH SCHOOL-CONFERENCE ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

Book of Abstracts of the Young Scientists' School-Conference, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences (RAS)

October 12–16, 2026

St. Petersburg

POLYTECH PRESS
Peter the Great
St.Petersburg Polytechnic
University

St. Petersburg
2026

Reviewers:
N. A. Barlev, Doctor of Biological Sciences,
Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Gene Expression Regulation, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences
N. A. Mikhailova, Doctor of Biological Sciences,
Head of the Laboratory of Cellular Biotechnologies, Center for Cell Technologies, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences

X Youth School-Conference on Molecular and Cellular Biology : Book of Abstracts of the Young Scientists' School-Conference, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences (RAS), October 12–16, 2026, St. Petersburg. – St. Petersburg : POLYTECH-PRESS, 2026. – 448 p.

PROGRAMME COMMITTEE
Chairman
TOMILLIN A. N., Corresponding Member of the RAS
Deputy Chairman
MALASHICHEVA A. B., Dr. of Sci. (Biology)

BERDIEVA M. A., Ph.D. (Biology)
GUZHOVA I. V., Sc.D. (Biology)
KORNILOVA E. S., Sc.D. (Biology)
MIKHAILOVA N. A., Sc.D. (Biology)
LYUBLINSKAYA O. G., Ph.D. (Physics and Mathematics)
ENUKASHVILI N. I., Ph.D. (Biology)
OSTROUMOVA O. S., Sc.D. (Biology)

ORGANISING COMMITTEE
Chairman
MORSHNEVA A. V., PhD (Biology)
Deputy Chairman
GENNAYA Yu. A.

ALKHASAN B.
BELYAEVA A. A.
GNEDINA O. O., PhD (Biology)
GURYEV N. A.
DOCSHIN P. M., PhD (Biology)
DUTYSHEVA E. A., PhD (Biology)
ZLODEEVA P. D.
ISHMANOV T. F.
KARPOVA N. D.
KRASKOVSKAYA N. A., PhD (Biology)
KUNEEV I. K.
LITVINOV I. K.
MARTYNYUK V. A.
MARCHENKO D. M.
MIKELADZE M. A., PhD (Biology)
NEVZOROV I. A.
PALIY O. S.
POZDNYAKOV D. Yu.
RUDNEVA Z. M.
SAFONOV P. Yu., PhD (Biology)
SEMENOV O. M.
SERDIUKOVA D. A., PhD (Biology)
SMIRNOVA D. V.
TISHKOVA M. V.
FATYKHOV I. R.
FEFILOVA E. A.
CHABINA A. S.
SHEKUNOV E. V., PhD (Biology)

WITH THE SUPPORT OF:
Big Scientific Project No. 075-15-2025-482
OOO LMK
AO Biochimmac
OOO Profilab
OOO Skygen
OOO Lumiprobe RUS
OOO BMT
OOO Dia-M
OOO ArtBioTech
OOO Lacopa
OOO Vermes

ISBN 978-5-7422-9638-6
doi:10.18720/SPBPU/2/id26-563

© Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, 2026
© Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 2026

Биология клетки: внутриклеточные процессы в норме и патологии

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЯДЕРНОЙ КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИИ КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТОК МЫШИ: КОНФОКАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МАРКЕРОВ ХРОМАТИНА И КОИЛИН-СОДЕРЖАЩИХ ТЕЛЕЦ

Анисимов А.С.[1*], Боголюбова И.О[2]

1. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: alexey.nisimov@gmail.com*

Кумулюсные клетки (КК) выполняют ключевые трофические и регуляторные функции, влияя на компетентность ооцита к развитию (Russell & Robker, 2018). Как легкодоступный материал в программах ЭКО, КК перспективны для поиска маркеров возрастной дисфункции яичника и качества ооцита. Цель работы – охарактеризовать возрастные изменения компартментализации ядер КК мыши. Исследование выполнено на самках BALB/c двух групп: молодые (2–3 мес.) и старые (12–14 мес.). В серии с коилином использовали дополнительную группу среднего возраста (6–7 мес.). Методами иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии визуализировали H4K5ac, ATRX и коилин. Разработан алгоритм автоматической 3D-сегментации и анализа ядерных структур на конфокальных изображениях.

Ключевым результатом стало двукратное повышение уровня H4K5ac в ядрах старых животных ($p < 0.001$). Это согласуется с усилением оксидативного стресса в КК с возрастом (Isola et al., 2024) и ролью H4K5ac в обеспечении доступа факторов репарации ДНК (Peterson & Côté, 2004). Хроматин-ремоделирующий белок ATRX у молодых животных концентрировался в областях хроматина, интенсивно окрашивающихся DAPI, что соответствует его функции в поддержании гетерохроматина в составе комплекса DAXX-ATRX (Drané et al., 2010). С возрастом эта локализация нарушалась:

ассоциированный с ATRX сигнал выявлялся в виде более мелких и хаотично расположенных по ядру фокусов.

Анализ коилин-позитивных структур, которые могут представлять собой как тельца Кахаля, так и ассоциированные с ними тельца гистонового локуса (Geisler et al., 2023), выявил прогрессирующее возрастное снижение их числа на ядро ($p < 0.01$). Это согласуется с данными о том, что накопление повреждений ДНК ассоциируется с разрушением телец Кахаля (Baltanás et al., 2010).

Таким образом, старение КК in vivo сопряжено с гиперацетилированием гистона H4 по лизину в 5-м положении, реорганизацией хроматина и снижением числа коилин-позитивных телец. Выявленные изменения открывают перспективу для использования данных параметров в качестве потенциальных маркеров функционального состояния ядра КК в контексте репродуктивного старения женского организма и, в перспективе, для оценки влияния фармакологических препаратов на фолликулярное микроокружение ооцита.

СКОРОСТЬ ДРОБЛЕНИЯ И БЛАСТУЛЯЦИИ У ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА С НАРУШЕНИЯМИ КАРИОТИПА

Архипова Т.С.[1,2*], Сайфитдинова А.Ф[1,2,3]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *АО «Международный центр репродуктивной медицины», Санкт-Петербург, Россия*
3. *ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет имени А.И. Герцена», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: archipova_tanya@mail.ru*

В отличие от полных анеуплоидий, возникающих в результате мейотических ошибок и коррелирующих с возрастом генетической матери, митотические нарушения в ходе раннего эмбриогенеза не

связаны с возрастом и могут возникать с равной вероятностью у пациенток любого репродуктивного возраста. Нарушение сегрегации хромосом в митозе (приводящее к мозаицизму по отдельным хромосомам), хаотический мозаицизм или потеря отдельных сегментов хромосом в части клеток эмбриона может рассматриваться в качестве паттерна геномных нарушений, связанных с морфокинетическими параметрами развития.

Цель исследования сравнить скорость доимплантационного развития эмбрионов человека с различными нарушениями в молекулярном кариотипе.

В исследование вошли данные, полученные в АО МЦРМ (эмбрионы, полученные из свежих ооцитов, имеющие на момент проверки результатов оплодотворения два пронуклеуса). Оценку молекулярного кариотипа проводили методами NGS, arrayCGH. Типы нарушений классифицировали как, мозаицизм (289 эмбрионов, из них хаотический мозаицизм - 57) и сегментные аномалии (246 эмбрионов). Для оценки скорости развития, каждая группа эмбрионов 5, 6 и 7 дней развития была разделена на две подгруппы: 1 - ранние бластоцисты, и 2 - сильно экспандированные. Во всех трёх группах отмечено преобладание бластоцист, сформировавшихся к 5-му дню развития: при мозаицизме – 72,66% (210), при хаотическом мозаицизме – 64,91% (37), при сегментных нарушениях – 65,86% (162). Доля бластоцист 6-го дня развития составила 27,0%, 33,34% и 33,3% соответственно. Анализ распределения по подгруппам выявил закономерную динамику: на 5-й день развития во всех группах преобладали ранние/малоклеточные бластоцисты (подгруппа 1) – 55,24%, 72,97% и 58%, тогда как к 6-му дню было больше сильно экспандированных бластоцист (подгруппа 2) – 59%, 58% и 58,54% соответственно. К 7-му дню развития во всех группах стадии бластоцисты достигали единичные эмбрионы. Частота фрагментации была сопоставима между группами и составила 39,1%, 40,4% и 35,8% соответственно. Большинство мозаичных эмбрионов достигают стадии бластоцисты на 5 день развития, что сопоставимо со скоростью развития

эуплоидных эмбрионов, следовательно, наличие мозаицизма в большинстве случаев не ассоциировано с доимплантационной задержкой развития. При этом, оказалось, что эмбрионы с сегментными нарушениями кариотипа могу достигать стадии бластоцисты лишь к 7 дню развития. Частота фрагментации сопоставима при всех типах нарушений (35,77–40,35%).

СОДЕРЖАНИЕ ВНДНК В ЖИДКОСТИ ФОЛЛИКУЛОВ ИЗ ЯИЧНИКОВ SUS SCROFA DOMESTICUS НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА

Баранова Е.И.[1*], Кузьмина Т. И.[1]

1. *Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: elenabaranova666@gmail.com*

Известно, что ооциты из антральных фолликулов d > 3 мм, обладают высокой компетентностью к созреванию и оплодотворению *in vitro* (Bartková et al., 2024; Bezerra et al., 2021). Реализация этого потенциала во многом зависит от микроокружения, структурно представленного клетками гранулезы и жидкостью фолликулов, а также от стадии овариального цикла. В настоящее время показатели уровня содержания внеклеточной ДНК (внДНК) активно используются при диагностике патологий в клинической медицине, а также в пренатальной диагностике. В репродуктивной биотехнологии животных внДНК рассматривается как перспективный неинвазивный биомаркер качества донорских ооцитов, используемых в клеточных (эмбриотрансфер, клонирование) и генных технологиях (трансгенез).

Цель настоящего исследования – оценить уровень содержания внДНК в жидкости фолликулов *Sus Scrofa Domesticus* диаметром 3–

6 мм из яичников на различных стадиях эстрального цикла (фолликулярной и лютеиновой).

Жидкость аспирировали из 199 фолликулов ø 3–6 мм, ранжированных в соответствии со стадией эстрального цикла, и центрифугировали 5 минут при 603,72 g, затем супернатант центрифугировали 10 минут при 1690 g. Всего проанализировано 20 яичников в фолликулярной и лютеиновой фазе (10 в каждой группе). Выделение и очистку внДНК проводили фенольным методом (Albariño и Romanowski, 1994). Концентрацию внДНК определяли на спектрофотометре ND-100C (Hangzhou MIU Instruments Co., Ltd.). Достоверность исследуемых средних значений оценивали с помощью критерия Стьюдента при трех уровнях значимости: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.

Установлено, что концентрация внДНК в фолликулярной жидкости свиней имеет статистически значимые различия в зависимости от стадии эстрального цикла яичника. В лютеальную фазу овариального цикла содержание внДНК в фолликулах составило 19,36±5,58 нг/мкл, что достоверно превышало аналогичный показатель в фолликулярную фазу (7,7±3,6 нг/мкл, на 11,66 нг/мкл выше, $p < 0,05$). Результаты экспериментов свидетельствуют о возможности использования показателя «уровень содержания внДНК» в жидкости овариальных фолликулов, как биомаркера качества донорских ооцитов *Sus Scrofa Domesticus*. А учитывая генезис внДНК, можно предположить, что высокое содержание внДНК в жидкости фолликулов в лютеиновую фазу эстрального цикла яичников детерминировано активизацией в них атретических процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания Министерства науки и высшего образования (№ FGGN-2024–0014).

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ NOTCH КАК РЕГУЛЯТОР ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭНДОТЕЛИЯ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА

Басович Л.С.[1,2*], Смирнова Д.В.[1], Сердюкова Д.А.[1], Малашичева А.Б.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: basovich@incras.ru*

Эндотелиальный монослой, покрывающий створки аортального клапана, испытывает постоянное воздействие напряжения сдвига, создаваемого током крови. Физиологический ламинарный поток со стороны левого желудочка индуцирует протективный эффект эндотелиальных клеток клапана (ЭКК), ингибируя трансдифференцировку интерстициальных клеток клапана (ИКК), фиброз и кальцификацию. Напротив, турбулентный поток со стороны аорты вызывает повреждение слоя ЭКК и запускает патологическую активацию ИКК. Механозависимый сигнальный путь Notch играет ключевую роль как в эмбриональном формировании клапана, так и в его гемодинамической регуляции во взрослом организме.

Целью исследования являлась оценка влияния активации и подавления сигнального пути Notch на протективную активность ЭКК, культивируемых в условиях физиологического напряжения сдвига, воспроизводимого системой IBIDI Pump System. ЭКК были получены от пациентов с кальцинированным аортальным стенозом. Модификация клеточных культур проводилась трансдукцией лентивирусами, кодирующими внутриклеточный домен рецептора Notch1 (*hN1ICD*) для активации и короткой шпилечной РНК (*shNotch1*) для нокдауна. Через 24 часа после трансдукции ЭКК помещались в систему IBIDI, и уровень экспрессии генов

оценивался ОТ-кПЦР через 72 часа культивирования в условиях ламинарного потока.

Гиперактивация *hN1ICD* в ЭКК приводит к увеличению экспрессии *ACTA2*, *SNAI2* и снижению *vWF*, указывающих на запуск эндотелиально-мезенхимного перехода. В то же время, оверэкспрессия *hN1ICD* препятствует увеличению уровня *KLF2*, что объясняет сохранение патологического фенотипа ЭКК в условиях напряжения сдвига.

Напротив, подавление *hNOTCH1* в условиях ламинарного потока индуцирует протективный фенотип ЭКК: вытягивание по потоку, усиление экспрессии *PECAM1* и *KLF2*.

Таким образом, напряжение сдвига действует как усилитель транскрипционной активности протективных механочувствительных генов. Однако активация Notch-сигналинга способствует патологической трансформации эндотелия даже в условиях нормальной гемодинамики.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-15-00280).

ЭКСПРЕССИЯ САТЕЛЛИТНОЙ ДНК ЧЕЛОВЕКА В ОПУХОЛИ И ЕЁ МИКРООКРУЖЕНИИ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Белик Л.А.[1,2*], Енукашвили Н.И.[1,2], Семенова Н.Ю.[2], Мартынкевич И.С[2].

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБУ «РосНИИГТ ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: l.a.belik@list.ru*

Транскрипция тандемно повторяющейся некодирующей ДНК, в том числе сателлитной ДНК (сатДНК), образующей центромерные (альфа-сателлитная ДНК) и прицентромерные участки хромосом,

часто ассоциирована с развитием рака. В основном она наблюдается в опухолевых клетках, участвуя в реорганизации их генома и прогрессии заболевания. Активность сатДНК в опухолевом микроокружении исследована меньше, несмотря на то что оно является важным фактором развития опухолей. Мы сфокусировались на изучении особенностей микроокружения множественной миеломы (ММ) – неизлечимого гемобластоза, поражающего костный мозг (КМ). Микроокружение для клеток ММ образуют составляющие гемопоэтической ниши КМ, в т. ч. мезенхимные стромальные клетки (МСК), которые положительно влияют на выживаемость опухолевых клеток при воздействии цитостатиками. Цель работы – исследование активности сатДНК в МСК опухолевого микроокружения и в опухолевых клетках при ММ.

Исследование выполнено на клетках ММ линии RPMI-8226 и культурах МСК КМ, полученных из аспиратов КМ пациентов с ММ (от всех пациентов получено письменное информированное согласие, исследование одобрено локальной этической комиссией РосНИИГТ ФМБА России). МСК и RPMI-8226 для изучения их взаимного влияния сокультивировали в планшетах со вставками с диаметром пор 0,4 мкм (бесконтактное сокультивирование). Транскрипционную активность сатДНК исследовали методом кПЦР.

Транскрипция сателлитов человека 2 и 3 (HS2/HS3), входящих в состав прицентромерной ДНК, оказалась повышена в МСК опухолевого микроокружения по сравнению с МСК КМ здоровых доноров. В последних она повышалась при условии сокультивирования с RPMI-8226. В самих клетках ММ при этом уровни транскрипции HS2/HS3 не повышались.

Анализ уровней транскрипционной активности центромерной альфа-сателлитной ДНК продемонстрировал, что в клетках RPMI-8226 она повышена в 61.82 ± 27.34 раза по сравнению с МСК КМ пациентов. При этом сокультивирование с МСК понижало её транскрипцию в RPMI-8226 в 2.42 ± 0.69 раз. Уровень мРНК альфа-

сателлитной ДНК в МСК в целом были существенно ниже и не изменялся после сокультивирования с RPMI-8226.

Таким образом, изменение транскрипционной активности сатДНК ассоциировано с прогрессией ММ. Разные типы сатДНК (прицентромерная и центромерная) по-разному транскрибируются в опухолевых клетках и в опухоль-ассоциированных МСК КМ, что может отражать разные функции транскрибируемых с них некодирующих РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФМБА России (проект № 123051000061-1).

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПЕПТИДНЫХ ДЕНДРИМЕРОВ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Болгова И.А.[1,2*]-Куликова Е.И.[1,2], Тарасенко И.И.[3], Большакова О.И.[1]

1. *ФГБУ Петербургский институт ядерной физики имени Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский государственный технологических институт, Санкт-Петербург, Россия*
3. *Филиал ФГБУ Петербургский Институт Ядерной Физики имени Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский Институт» – Институт Высокомолекулярных Соединений, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: irina.bolgova2000@mail.ru*

Дендримеры – класс сильно разветвленных, монодисперсных макромолекул с характерной идеально определенной симметричной архитектурой. Уникальные свойства, позволяют применять дендримеры в самых разных областях, в том числе использовать как основу препаратов для терапии тяжелых плохо поддающихся лечению болезней, таких как онкология и нейродегенеративные заболевания. Согласно некоторым исследованиям, дендримеры

обладают селективной токсичностью по отношению к опухолевым клеткам, что может быть использовано при создании протипоопухолевых агентов. Однако, понятие токсичности препарата включает не только нарушение внутриклеточных функций, приводящее к гибели клеток, но и охватывает такие процессы как биораспределение, фармакокинетика и метаболизм, что может объяснять различные реакции на дендримеры в системах *in vitro*, и *in vivo*,

Цель данного исследования: анализ токсичности пептидных дендримеров Lys-2Gly, Lys-2His, Lys-2Lys и Lys-2Arg на линиях нормальных и опухолевых клеток, в также дендримера Lys-2Arg на *Drosophila melanogaster*.

Для анализа использовались линии опухолевых клеток HeLaG63, HT1080 и A549, а также нормальные фибробласты кожи человека – линия DF2. Для определения цитотоксичности применяли MTT-тест, анализ апоптоза, измеряли импенданс клеток и уровень активных форм кислорода. На *Drosophila melanogaster* определяли влияние токсичного в системе *in vitro* дендримера Lys2-Arg на продолжительность жизни мух и их локомоторную активность как маркеры токсичности.

Показано, что дендримеры Lys-2Gly и Lys-2His обладают низкой токсичностью для клеток DF2 и HeLaG63 более высокой - для клеток HT1080. Дендримеры Lys-2Lys и Lys-2Arg продемонстрировали высокую токсичность для всех исследованных клеток, но более выраженную для линий опухолевых клеток, особенно для HT1080 и A549. Однако токсичный для клеток дендример Lys-2Arg не оказывал негативного влияния на *Drosophila melanogaster* при его добавлении в корм животным.

Таким образом, исследуемые дендримеры обладают разной токсичность *in vitro*, во всех случаях селективной по отношению к разным клеткам. Токсичный в системе *in vitro* дендример оказался нетоксичным *in vivo*. Полученные результаты следует учитывать при разработке новых препаратов на основе дендримеров.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИИ ЦЕНТРОМЕРНОЙ А-САТЕЛЛИТНОЙ ДНК ЧЕЛОВЕКА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Буснюк Т.А.[1*], Пономарцев Н.В.[1], Енукашвили Н.И.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: timofeibus@mail.ru*

Центромерные районы хромосом располагаются в массивах, образованных одним из семейств тандемных повторов — α-сателлитной ДНК. Конкретно активная центромера (область, на которой происходит сборка белков кинетохора) представлена иерархически организованной α-сателлитной ДНК (HORs - High Order Repeats). Исследования последних десятилетий сообщают о транскрипционной активности данных некодирующих элементов генома, а также об участии самих транскриптов α-сателлитной ДНК в процессах, связанных с центромерной функцией: стабилизация кинетохора в ходе митоза и загрузка центромер-специфичного гистона CENP-A. Учитывая характерную для опухолевых клеток повышенную пролиферативную активность, а также непосредственное участие транскриптов α-сателлитной ДНК в процессе клеточного деления, можно предположить повышенный уровень экспрессии α-сателлитов в опухолевых клетках по сравнению с нормальными пролиферирующими клетками.

Цель работы: количественная оценка и сопоставление транскрипции α-сателлитной ДНК в опухолевых клеточных линиях A549, U937 и THP1 и в нормальных постнатальных стволовых клетках, способных к пролиферации.

Использованы опухолевые линии A549, U937, THP-1 и культура СКПЗ (стволовые клетки пульпы зуба) в качестве контроля. Из клеток выделяли тотальную РНК, на её матрице получали кДНК. Подобраны праймеры к активным центромерным HOR хромосом 13 и 22 и к перицентромерным мономерным α-сателлитам хромосомы

21. Уровень экспрессии оценивали методом ПЦР в реальном времени с нормализацией по референсным генам GAPDH и ACTB. Относительный уровень рассчитывали методом ΔΔCt.

Выявлено статистически значимое повышение транскрипции во всех опухолевых линиях по сравнению с СКПЗ. Наиболее выраженные значения для праймера к 22-й хромосоме наблюдались в THP-1, для праймера к хромосоме 13 — в A549. Транскрипция мономерных α-сателлитов 21-й хромосомы, хотя и наблюдалась, но не оказалась статистически значимой.

В ходе данной работы проведено количественное сравнение экспрессии α-сателлитной ДНК в клетках опухолей различного происхождения. Полученные данные свидетельствуют, что при онкогенной трансформации преимущественно активируется транскрипция центромерных HOR, тогда как периферические мономерные α-сателлиты затронуты в меньшей степени. В случае подтверждения, анализ активности этих последовательностей в тканях опухоли может стать дополнительным прогностическим фактором.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России для ИНЦ РАН (№126022017769-3).

ВКЛАД ИЗОФОРМ RUNX3 В ПОДДЕРЖАНИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК ПРИ ЛЕЙКОЗАХ

Ведерникова В.О.[1,2*], Спирин П.В.[1], Прасолов В.С.[1]

1. *Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*
2. *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия*

E-mail: vedernikova.vo@phystech.edu*

Известно, что нарушение нормальной активности транскрипционных факторов может быть сопряжено с развитием и течением различных заболеваний, в том числе лейкозов. RUNX3 – транскрипционный фактор, относящийся к семейству белков RUNX, включающему RUNX1, RUNX2, RUNX3. Каждый из этих белков представлен различными изоформами, что обуславливается контролем экспрессии кодирующих их генов с двух промоторов, а также альтернативным сплайсингом. В частности, белок RUNX3 представлен четырьмя изоформами: p46, p44, p33 и p27, каждая из которых обнаруживается в миелоидных клетках. Однако роль отдельных изоформ в развитии и прогрессии злокачественных заболеваний крови все еще окончательно не ясна.

На основе клеточной линии острого миелоидного лейкоза с относительно высокой экспрессией *RUNX3* (Mv4;11) и Т-лимфобластного лейкоза с относительно низким уровнем экспрессии *RUNX3* (Jurkat) получены модельные клеточные линии с гиперэкспрессией отдельных изоформ данного белка. Гиперэкспрессия была подтверждена методами ОТ-ПЦР и Вестерн-блот анализом. Оценен вклад отдельных изоформ RUNX3 в выживаемость клеток в условиях нормального и пониженного уровня кислорода. Установлено влияние изоформ на регуляцию биогенеза лизосом и аутофагосом на уровне белков, вовлеченных в регуляцию аутофагии (Beclin-1, p62, Atg5, Atg12, LC3B), а также с помощью красителей, специфичных в отношении данных органелл.

Оценена чувствительность клеточных линий с гиперэкспрессией отдельных изоформ RUNX3 к различным модуляторам аутофагии (Хлорохин, Бафиломицин-А1, Рапамицин, Венетоклакс) в условиях нормоксии и гипоксии, а также определено их влияние на представленность лизосом и аутофагосом в ответ на обработку препаратами. Оценен вклад гиперэкспрессии изоформ RUNX3 в метаболический статус клеток.

ОСОБЕННОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ USP7 ОТНОСИТЕЛЬНО ИЗОФОРМ PML, UBC9 И MDM2

Ведешкина Е.С.[1,2*], Смирнов Е.Ю.[1], Силонов С.А.[1,3], Фонин А.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*
3. *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: ekvedeshkina@yandex.ru*

Ядерные PML-тельца (PML-NBs) – динамические ядерные структуры, выполняющие важные структурные и регуляторные функции в клетке. В их формировании и функционировании важную роль играет убиквитин-специфическая протеаза 7 (USP7) – деубиквитиназа, стабилизирующая MDM2 и участвующая в рекрутировании SLX4 в PML-тельца через взаимодействие с сумоилированным UBC9. Первый этап сборки PML-телец предположительно происходит по механизму фазового перехода «жидкость-жидкость» (LLPS), инициируемого слабыми взаимодействиями внутренне неупорядоченных С-концевых участков изоформ белка PML. Стоит отметить, что PML представлен семью основными изоформами (PML-I–VII), идентичными по N-

концу, но различающимися С-концевыми участками. Последующая структурная сборка PML-телец критически зависит от сумоилирования N-концевых остатков лизина PML (K65, K160, K490). Известно, что степень сумоилирования изоформ определяет не только их локализацию, но и устойчивость к деградации [N]. (Hands et al., 2014, Fonin et al., 2022, Silonov et al., 2026). На сегодняшний день изоформ-специфические особенности взаимодействия PML с USP7, роль С-концевых доменов и фазового разделения в рекрутировании USP7, а также пространственная связь USP7 с UBC9 и MDM2 остаются недостаточно описанными. В связи с чем целью настоящей работы являлось изучение пространственной колокализации USP7 с семью основными изоформами PML, а также с UBC9 и MDM2. На основе клеточных линий HeLa и U2OS были созданы стабильные линии, экспрессирующие USP7-RFP совместно с PML(I–VII)-EGFP, UBC9-EGFP или MDM2-EGFP. Проведённый анализ с использованием конфокальной микроскопии показал, что USP7 может колокализоваться с ядерными изоформами PML-I–PML-VI, тогда как цитоплазматическая изоформа PML-VII не показала колокализации с USP7. Полученные данные указывают на опосредованность взаимодействия USP7 с PML-тельцами уникальными С-концевыми доменами ядерных изоформ. Также было обнаружено, что USP7 колокализуется с UBC9 и MDM2, подтверждая функциональную связь USP7 с SUMO-аппаратом и согласуясь с её классической ролью в стабилизации MDM2. Выявленные морфологические различия ядерных фокусов, образующихся при коэкспрессии USP7 с разными изоформами PML, свидетельствуют о существовании различных паттернов и механизмов включения USP7 в состав PML-телец, что позволяет предположить изоформ-специфическую регуляцию функциональной активности USP7 в отношении её субстратов внутри ядерных PML-телец.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (проект № 25-75-10128).

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯЦИИ HIPPO СИГНАЛЬНОГО ПУТИ НА АЛЬВЕОЛОЦИТЫ И PDGFRA+ КЛЕТКИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ТОНКИХ СРЕЗОВ ЛЕГКИХ МЫШИ В ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ДИНАМИКЕ

Воложинская А.А.[1*], Говорова И.А.[1], Воротеляк Е.А.[1,2]

1. *Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия*

E-mail: volozhinskayaalexsanra@mail.ru*

Hippo/Yap сигнальный путь принимает участие в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки клеток, а также регенерации ткани легких. Pdgfrα+ клетки мезенхимы являются микроокружением альвеолоцитов и обеспечивают поддержание и восстановление структуры альвеол. Целью данной работы было исследование влияния Hippo сигнального пути на клетки альвеолярного эпителия и их мезенхимного микроокружения на модели органотипического культивирования тонких срезов легких мыши в течение длительного времени.

Легкие мыши C57Bl/6 заполняли 2% агарозой. Затем доли легкого нарезали на вибротоме толщиной 150 мкм и культивировали в среде DMEM с добавлением гентамицин (0,8%) и амфотерицина (0,05%) при 37 ^{0}C. Для активации Hippo сигналинга использовали Py-60 (10 мкМ), для ингибирования использовали вертепорфин (1 мкМ). Иммуногистохимический анализ (ИГХ) проводили через 2, 4, 6, 8, 10 и 48 часов культивирования, оценивали доли мезенхимы (Pdgfrα+), альвеолоцитов 1го типа (Ager+) – AT1 и 2го типа (Sftpc+) – AT2.

В ходе эксперимента количество Pdgfrα+ клеток постепенно снижалось во всех временных точках. При воздействии Py-60 изменения были менее выражены и соответствовали динамике контроля. Анализ AT1 клеток показал, что при активации Yap их количество возрастало, что подтверждалось повышением

экспрессии гена *Ager* согласно ПЦР. В группе вертепорфина доля AT1 снижалась. Для AT2 клеток при воздействии Py-60 наблюдалось снижение количества относительно контроля на протяжении всего эксперимента, что соответствовало изменению экспрессии гена *Sftpc* при ПЦР анализе. Вертепорфин приводил к менее выраженному изменению доли AT2 клеток

Полученные данные показывают, что активация Yap преимущественно влияет на альвеолярный эпителий: возрастает доля AT1 клеток и снижается доля AT2 клеток. Изменения в популяции Pdgfra+ клеток мезенхимы были менее выраженными. Вероятно, уменьшение количества Pdgfra+ клеток связано с дифференцировкой AT2 клеток в AT1 при активации Yap, однако не исключен обратный механизм, при котором сокращение Pdgfra+ клеток через эпителио-мезенхимные взаимодействия индуцирует дифференцировку AT2 клеток. Для более точного анализа данных механизмов необходимы дальнейшие исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-74-30015-П).

АНАЛИЗ ТОКСИЧНОСТИ ГЕТЕРОСТРУКТУР, СОСТОЯЩИХ ИЗ БОРСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ И ФУЛЛЕРЕНА C_{60}, В ОТНОШЕНИИ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Ганина А.А.[1,2*], Большакова О.И.[1], Лебедев В.Т.,[1] Саранцева С.В.[1]

1. *Петербургский институт ядерной физики имени Б. П. Константинова Национального Исследовательского Центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*
2. *Санкт-Петербургский государственный технологический институт, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: nastya.ganina04@mail.ru*

Известно, что соединения бора обладают выраженной антимикробной активностью и физико-химическими свойствами, улучшающими механические характеристики биоматериалов, что может быть использовано при создании антисептических повязок, способствующих лучшему заживлению ран. Кроме того, соединения бора применяются в одном из методов лучевой терапии опухолей – бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ). Поэтому разработка и исследование новых материалов для биомедицины, содержащих бор, имеют особое значение.

Целью данной работы был анализ токсичности гетероструктур, содержащих борофеноподобные наночастицы и фуллерен C_{60} на культурах клеток.

В исследовании использовались 4 образца, один из которых представлял собой наночастицы окисленного бора в плоской форме (борофеноподобные), а три других содержали дополнительно фуллерен C_{60} в различных концентрациях (1,1 мг/мл; 2,3 мг/мл и 4,4 мг/мл). Анализ проводили на нормальных (DF2) и опухолевых (A549, HeLa) клетках. Цитотоксичность оценивали при помощи МТТ-теста, а интернализацию – методом иммуногистохимии.

Было показано, что присоединение фуллерена к борсодержащим частицам снижало токсичность гетероструктур. При увеличении

концентрации фуллерена в гетероструктуре эффект возрастал. Для нормальных клеток снижение было более выражено, чем для опухолевых. Наиболее чувствительной к воздействию оказалась линия A549. Частицы с фуллереном продемонстрировали способность проникать в опухолевые клетки HeLa, что важно для применения новых препаратов в тераностике с использованием пьезо(фото)динамических методов.

Полученные данные указывают на то, что гетероструктуры являются перспективными для дальнейших разработок как в области тераностики рака, так и в области тканевой инженерии.

НОВЫЙ МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ УРОКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА В РАЗВИТИИ ФИБРОЗА: АКТИВАЦИЯ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕРЕЗ СИГНАЛИЗАЦИЮ TGF-B1/AKT

Гольцева Ю.Д.[1*], Белоглазова И.Б.[1], Парфенова Е.В.[1], Дергилев К.В.[1]

1. *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России, Москва, Россия*

E-mail: ydgoltseva@cardio.ru*

Ключевым событием в развитии фиброза является активация фибробластов (ФБ) и их трансформация в миофибробласты (миоФБ), активно продуцирующие белки внеклеточного матрикса. Урокиназный рецептор (uPAR) играет важную роль в этом процессе: показано, что срезание uPAR с поверхности ФБ запускает их трансформацию в миоФБ, а у мышей с дефицитом uPAR развивается спонтанный фиброз легких, почек и сердца. Однако механизмы, посредством которых дефицит uPAR запускает активацию ФБ, остаются малоизученными.

Целью данной работы являлось выяснение возможных молекулярных механизмов, посредством которых дефицит uPAR приводит к активации ФБ.

Методы. С помощью системы CRISPR/Cas9 получали стабильный нокаут гена *Plaur* (uPAR) в ФБ линии 3T3 (*Plaur* KO). *Plaur* KO и контрольные ФБ культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы, 10% сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина. Эффективность нокаута подтверждали проточной цитометрией (uPAR-FITC, Miltenyi Biotec). Продукцию коллагена I, фибронектина, αSMA и TGF-β1 оценивали методом иммуноблоттинга. Экспрессию генов оценивали методом ПЦР в реальном времени. 3T3 ФБ обрабатывали 10 нг/мл рекомбинантного TGF-β1 в течение 30 мин и 48 ч. Активацию сигнальных путей оценивали через 30 мин после стимуляции TGF-β1 по уровню фосфорилирования SMAD2/SMAD3 и Akt методом иммуноблоттинга.

Результаты. Нокаут *Plaur* приводил к снижению uPAR на поверхности ФБ в 6 раз по сравнению с контролем. *Plaur* KO ФБ характеризовались повышенным синтезом коллагена I (в 1,9 раз) и фибронектина (в 2,4 раза), при этом уровень αSMA не отличался. *Plaur* KO ФБ продуцировали в 7-9 раз больше биологически активного TGF-β1 при неизменной экспрессии гена *Tgfb1*. При стимуляции рекомбинантным TGF-β1 в *Plaur* KO ФБ наблюдалась значительная активация неканонического сигнального пути Akt: уровень фосфо-Akt повышался в 4 раза по сравнению с контрольными ФБ, стимулированными TGF-β1. При этом активация канонического пути (SMAD2/SMAD3) была менее выражена. Профибротический ответ на TGF-β1 в *Plaur* KO ФБ был значимо усилен: продукция белков коллагена I и фибронектина возрастала в 1,6 и 1,7 раза, соответственно, по сравнению с контрольными ФБ.

Заключение. Дефицит uPAR, вызванный генетическим нокаутом, способствует активации синтетического фенотипа ФБ через гиперактивацию TGF-β1 и запуск неканонического пути TGF-β1 /Akt.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 23-15-00540-П).

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НОВОГО АРХИТЕКТУРНОГО БЕЛКА PITF (CG2116) В ЯДРАХ ЭМБРИОНОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Губина М.Д.[1,2*], Саллум Г.[1], Максименко О.Г.[1], Георгиев П.Г.[1], Кудряшова К.С. [1]

1. *Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*
2. *Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия*

E-mail: madmgubina@edu.hse.ru*

Ключевые слова: Pitf, CG2116, архитектурные белки, промоторы, M1BP, ZIPIC, H3K9me3.

Архитектурный белок Pitf (CG2116) относится к группе белков с доменами цинковых пальцев C2H2-типа (C2H2-белков), взаимодействующих с белком CP190 и преимущественно связывающихся с промоторами генов домашнего хозяйства. Анализ ChIP-seq показал значительное перекрывание сайтов связывания Pitf с сайтами M1BP и ZIPIC — архитектурных белков, необходимых для функционирования активных промоторов. Несмотря на сходство их распределения по геному, пространственная организация Pitf в интерфазном ядре и его возможная локализация в составе общих ядерных компартментов ранее не исследовались.

Целью настоящей работы стало исследование внутриядерной локализации Pitf и анализ его пространственной связи с функционально родственными архитектурными белками и различными типами хроматина.

Для исследования использовали трансгенную линию, экспрессирующую Pitf, слитый с флуоресцентным белком mNeonGreen, а также фиксированные эмбрионы *Drosophila melanogaster*, окрашенные антителами против маркеров хроматина H3K9me3, H3K27me2/3, H3K4me3 и C2H2-белков M1BP и ZIPIC.

Установлено, что на ранних стадиях интерфазы Pitf распределен в ядре диффузно и не формирует характерных внутриядерных телец, свойственных некоторым другим архитектурным белкам. Однако в

поздней интерфазе (G2) наблюдается выраженное перераспределение белка и его накопление в отдельных участках хроматина. Предварительные результаты совместного иммуноокрашивания позволяют предположить, что данные участки соответствуют областям конститутивного гетерохроматина, содержащим эпигенетическую метку H3K9me3. Дополнительно проведен анализ внутриядерной колокализации Pitf с архитектурными белками M1BP и ZIPIC. Полученные данные позволяют оценить, образуют ли белки общих промоторных комплексов совместно пространственные домены в ядре.

Таким образом, Pitf обладает уникальной пространственной организацией, отличающейся от ранее исследованных архитектурных C2H2-белков. Отсутствие выраженных ядерных телец в сочетании с перераспределением белка на поздних стадиях интерфазы позволяет предположить существование специфического механизма участия Pitf в поддержании организации промоторов генов домашнего хозяйства.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ, (проект № 25-24-01040).

АССОЦИАЦИЯ ПОВЫШЕННОЙ ТРАНСКРИПЦИИ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ СУПЕРСЕМЕЙСТВА HERV-H|F С ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬЮ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИЕЙ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Доценко Н.Д.[1], Кольцова А.М.[1], Корчагина Н.М.[2], Калугина А.С.[3,4], Татищева Ю.А.[3], Соловьева А.И.[1], Енукашвили Н.И.[1*]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия*
3. *Общество с ограниченной ответственностью «Клиника репродукции «Скайферт»», Санкт-Петербург, Россия*
4. *ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: n.enukashvily@incras.ru*

Опухолевые и эмбриональные клетки млекопитающих схожи по ряду признаков (пролиферация, активация путей Wnt, Notch). Предположительно, активация транскрипции мобильных генетических элементов (транспозонов, ТЕ) также является общим свойством эмбрио- и онкогенеза.

Цель работы: сравнительный анализ уровня транскрипции ТЕ в соматических, эмбриональных, опухолевых клетках методами *in silico* и *in vitro*.

Материалы и методы: Опубликованные результаты секвенирования транскриптомов фибробластов, эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), клеток легочной аденокарциномы и происходящей из нее линии A549, а также линии нейробластом и множественной миеломы использовали для анализа дифференциальной экспрессии ТЕ. Набор ТЕ человека загрузили из базы Dfam. К наиболее активным ТЕ были подобраны праймеры. Методом количественной ПЦР (кПЦР) оценили экспрессию выявленных *in silico* ТЕ в бластоцистах 5-го дня, в клеточной линии ЭСК SC-5 (2 популяции:

недиференцированные и спонтанно дифференцирующиеся), в культурах раннего пассажа стволовых клеток пульпы зуба (СПКЗ), в линии эпителиального происхождения CFTE 29o-, в опухолевых клеточных линиях: U-937, RPMI 8226 (гематоонкологические новообразования), COLO 320 HSR, SW 837 (колоректальные опухоли), T98G, SK-N-MC (нейральные опухоли), SK-HEP-1, HeLa, A549, RPMI 2650 (эпителиальные опухоли).

Результаты: Показана дифференциальная экспрессия эндогенных ретровирусов человека *HERV-H, HERV-Fc1, HERV-Fc2* в транскриптомах ЭСК. Транскрипты *HERV-H* также выявлены в транскриптомах аденокарциномы легкого и линии A549. При анализе методом кПЦР, минимальное количество транскриптов *HERV-H* зарегистрировано в группе нормальных соматических клеток, максимальное (в 100 раз большее) – в бластоцистах, В линии ЭСК уровень транскрипции был ниже в 8 раз по сравнению с бластоцистами и далее снижался при дифференцировке. В опухолевых линиях уровень транскрипции *HERV-H* превышал экспрессию в нормальных клетках в 2–60 раз в зависимости от линии. Экспрессия *HERV-Fc1* детектирована в бластоцистах и некоторых опухолевых линиях, но не в соматических нормальных клетках. Экспрессия *HERV-Fc2* зафиксирована только в линии RPMI 8226.

Выводы: В доимплантационных эмбрионах и опухолевых клеточных линиях активирована экспрессия эндогенных ретровирусов супергруппы HERV-H|F. Понимание общих механизмов, лежащих в основе этой активации, открывает путь к разработке новых подходов онкотерапии.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России для ИНЦ РАН (№126022017769-3).

НОКДАУН ГЕНА DOPPELGANGER VON BRUMMER (DOB) ВЛИЯЕТ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ, ЛОКОМОТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ И ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН DROSOPHILA MELANOGASTER

Дудкова Ю.Ю.[1*], Саранцева С.В.[2], Шалагинова И.Г.[1]

1. *ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия*
2. *ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики имени Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: dudkova2004@mail.ru*

Drosophila melanogaster является подходящим модельным объектом для изучения патогенеза заболеваний человека. Отмечается, что многие молекулярные механизмы являются эволюционно консервативными и схожи у *Drosophila* и млекопитающих, в том числе и человека (Ogienko et al., 2022). Стоит отметить, что, около 75% генов человека, вовлеченных в различные заболевания, присутствуют в виде ортологов у дрозофилы, поэтому это удобные объекты для моделирования различных патологий (Yamaguchi et al., 2018).

Ген *doppelganger von brummer* (*dob*) кодирует триглицеридлипазу, участвующую в поддержании липидного гомеостаза в организме *Drosophila melanogaster*. Ген *dob* является ортологом человеческого гена *PNPLA2* (Grönke et al., 2005). Функция триглицеридлипазы dob и ее вклад в поддержание нормальной жизнедеятельности дрозофилы до сих пор до конца не изучена.

Целью данной работы является определение роли гена *dob* в регуляции продолжительности жизни, двигательной активности и липидном обмене *Drosophila melanogaster*.

Для проведения экспериментальной работы были получены гибриды с нокдауном *dob* во всех клетках (UAS-*dob* RNAi;*tub*-GAL4). В качестве контроля были взяты гибриды первого поколения от скрещивания UAS-*dob* RNAi x Canton-S и особи линии UAS-*dob*

RNAi. Для оценки локомоторной активности был проведен тест на отрицательный геотаксис 5-ти дневных имаго контрольной (UAS-*dob* RNAi) и экспериментальной (UAS-*dob* RNAi и *tub*-GAL4) группы. Для оценки выживаемости был проведен анализ продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*. Для анализа липидного обмена была проведена визуализация липидных капель в кишечнике и жировом теле с помощью конфокальной микроскопии. Для съемки липидных капель были взяты 20-тидневные имаго контрольной (гибриды скрещивания линий UAS-*dob* RNAi и Canton-S) и исследуемой (UAS-*dob* RNAi;*tub*-GAL4) групп.

По результатам работы было отмечено увеличение продолжительности жизни, локомоторной активности и количества липидных капель у имаго с нокдауном гена *dob*.

РОЛЬ ВОЛЬФРАМИНА 1 В НАРУШЕНИИ РЕГУЛЯЦИИ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И ПРОГРЕССИРОВАНИИ ГЛИОБЛАСТОМ

Живов Е.А.[1,2*], Бычков М.Л.[2], Шулепко М.А.[3], Кирпичников М.П.[1,4], Бабенко В.А.[5], Плотников Е.Ю.[5], Силачев Д.Н.[5], Яшин К.С.[6], Медяник И.А.[6], Семьянов А.В.[7], Шенкарев З.О.[1,2], Люкманова Е.Н.[1,3,4*]

1. *ГНЦ Институт биоорганической химии имени Шемякина-Овчинникова РАН, Москва, Россия*
2. *Московский центр перспективных исследований, Москва, Россия*
3. *Биологический факультет, Шэньчжэньский МГУ-ППИ университет, Шэньчжэнь, Китай*
4. *Биологический факультет, Московский государственный университет имени Ломоносова, Москва, Россия*
5. *Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия*
6. *Приволжский научно-исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия*
7. *Медицинский факультет, Цзясинский университет, Цзясин, Китай*

E-mail: evgeniy-kovalenko2016@mail.ru, lyukmanova_ekaterina@smbu.edu.cn*

Присутствующий в нейронах и ненейрональных клетках никотиновый ацетилхолиновый рецептор α7-типа (α7-нАХР) регулируется GPI-заякоренным белком Lynx1. При изучении экспрессии α7-нАХР и Lynx1 в модельных клетках глиобластомы и опухолевых тканях, полученных от пациентов, а также в первичных астроцитах было обнаружено, что Lynx1 в глиальных клетках накапливается почти исключительно в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) в незрелой форме, лишенной GPI-якоря, тогда как α7-нАХР локализован на плазматической мембране. Транспорт Lynx1 из ЭПР в аппарат Гольджи (АГ) был нарушен из-за снижения

экспрессии ЭПР-резидентного белка вольфрамина 1 (WFS1), который отвечает за гомеостаз Ca^{2+} внутри ЭПР, трафик секретируемых белков на пути ЭПР-АГ и контроль ЭПР-стресса. Дефицит зрелой формы Lynx1 на плазматической мембране приводит к нарушению регуляции α7-нАХР в клетках глиобластомы. Временная экспрессия WFS1 восстанавливает GPI-заякоривание и транспорт белка Lynx1 и замедляет рост клеток за счет механизма, опосредованного α7-нАХР. Применение рекомбинантного аналога Lynx1 для компенсации недостатка нативного Lynx1 снижало жизнеспособность клеток глиобластомы и приводило к остановке клеточного цикла, апоптозу, ингибированию митогенных киназ и воспалению. Эта компенсаторная стратегия была подтверждена на мышиной модели с трансплантированными опухолями глиомы С6. Мы предполагаем, что прогрессирование α7- нАХР-положительных глиом происходит по многоступенчатому механизму: снижение экспрессии WFS1, активация ЭПР-стресса по PERK- и IRE1-опосредованным механизмам, нарушение процессинга и транспорта Lynx1 на поверхность плазматической мембраны, нарушение регуляции онкогенного α7-нАХР, усиление митогенной внутриклеточной передачи сигналов и предотвращение апоптоза.

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

ВЛИЯНИЕ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ И АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКОГО

Жилин П.А.[1,2*], Зенов М.А.[1,2], Иванов А.В.[1]**

1. *ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН», Москва, Россия*
2. *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: zh1lin.pav@yandex.ru*

*** martin.zenov@yandex.ru*

Энтеровирусы представляют собой значимую группу патогенов человека, вызывающих широкий спектр заболеваний – от респираторных инфекций до тяжелых поражений ЦНС (Palacios, Oberste, 2005), и рассматриваются как перспективные онколитические агенты (Kaufman et al., 2015). Успех их репликации зависит от способности перестраивать клеточный метаболизм, в котором митохондрии играют ключевую роль, обеспечивая клетку энергией, участвуя в биосинтезе макромолекул и регулируя апоптоз (Romero-Cordero et al., 2021). Взаимосвязь между функциональным состоянием митохондрий и эффективностью репродукции энтеровирусов, однако, изучена недостаточно.

Цель работы – изучить влияние метаболического статуса митохондрий на эффективность репродукции энтеровирусов на примере вируса Коксаки B2 (штамм Ohio), полиовируса 2 типа (штамм Sabin) и эховируса 1 типа (штамм Farouk) в клетках глиобластомы U-87 MG и аденокарциномы легкого H1299. Пермиссивность клеток и темпы репликации энтеровирусов оценивали иммуноцитохимическим окрашиванием и титрованием методом Рида и Менча. Функциональное состояние митохондрий анализировали по изменению трансмембранного потенциала методом проточной цитометрии с применением потенциал-чувствительного красителя TMRE. Морфологию митохондрий

анализировали с помощью красителя MitoTracker Red CM-H_2XRos и конфокальной микроскопии. Зависимость репликации энтеровирусов от метаболизма митохондрий оценивали с использованием фармакологических ингибиторов I респираторного комплекса и окрашивания резазурином.

Установлено, что обе клеточные линии пермиссивны к исследованным энтеровирусам, о чем свидетельствовал характерный рост инфекционных титров. Энтеровирусы вызывают деполяризацию митохондриальной мембраны, коррелирующую с накоплением вирусного потомства. Наиболее выраженное падение потенциала наблюдалось в клетках H1299, инфицированных эховирусом 1 типа. Методом конфокальной микроскопии выявлено, что все три вируса провоцируют фрагментацию митохондрий в клетках обеих линий. Ингибирование комплекса I дыхательной цепи митохондрий метформином и фенформином существенно подавляло репликацию энтеровирусов и снижало цитопатический эффект.

Совокупность результатов позволяет полагать, что регулируемые вирусами метаболические пути в митохондриях могут рассматриваться в качестве потенциальных мишеней для разработки средств противовирусной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-24-00596).

МОРФОКИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДОИМПЛАНТАЦИОННОГО РАЗВИТИЯ *IN VITRO* МОЗАИЧНЫХ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

Жиляева В. Ю.[1,2*], Ищук М.А.[2], Сагурова Я.М.[2], Лесик Е.А.[2], Комарова Е.М.[2]

1. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д. О. Отта», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: lera.zhilyaeva.03@mail.ru*

Хромосомный мозаицизм представляет собой наличие у эмбриона двух и более клеточных линий с различным хромосомным набором, возникающих вследствие постзиготических митотических ошибок. Внедрение преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А) позволило выделить мозаичные эмбрионы в отдельную группу, однако морфокинетические особенности их раннего развития остаются недостаточно изученными. Морфокинетический анализ с использованием системы Time-Lapse рассматривается как перспективный неинвазивный метод оценки раннего эмбрионального развития.

Охарактеризовать особенности морфокинетического профиля доимплантационного развития мозаичных эмбрионов.

Проанализированы 13 эуплоидных донорских и 11 мозаичных эмбрионов пациентов, прокультивированных в инкубаторе, оснащенном системой Time-Lapse, и прошедших процедуру биопсии для последующего ПГТ-А. Оценивали время достижения основных стадий раннего развития. Для статистического анализа использовали критерий Манна–Уитни, различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Мозаичные эмбрионы характеризовались замедленными темпами раннего развития, то есть более поздним достижением основных стадий эмбриогенеза по сравнению с эуплоидными эмбрионами.

Статистически значимые различия выявлены на этапах дробления: t3, t4, t6, t7, t8, компактизации (tM) и бластуляции (tSB и tB). Также отличались интервалы между делениями: t3–t2 и t8–t4. Другие морфокинетические параметры достоверно не различались. При анализе аномалий дробления прямое деление бластомера с образованием трёх дочерних клеток выявлено у 4 из 11 (36,4%) мозаичных и не зарегистрировано в группе эуплоидных эмбрионов. Кроме того, у мозаичных эмбрионов наблюдался феномен обратного дробления.

Мозаичные эмбрионы характеризуются более длительным временем наступления основных стадий доимплантационного развития и повышенной частотой аномалий дробления по сравнению с эуплоидными донорскими эмбрионами. Полученные данные свидетельствуют о связи мозаичного кариотипа с нарушением динамики раннего эмбриогенеза и подтверждают перспективность использования системы Time-Lapse в качестве дополнительного неинвазивного метода оценки эмбриона.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ ПРИ ИНФЕКЦИИ ЭНТЕРОВИРУСАМИ: РОЛЬ ПОЛИАМИНОВ, МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ДЫХАНИЯ И ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ

Зенов М.А.[1,2*], Иванов А.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН», Москва, Россия*
2. *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: martin.zenov@yandex.ru*

Энтеровирусы являются важными патогенами человека, реплицирующимися как в нормальных, так и в опухолевых клетках, включая клетки глиобластомы (ГБ), однако взаимосвязь между вирусной репликацией и перепрограммированием клеточного метаболизма остаётся неясной. В данной работе мы охарактеризовали ключевые метаболические пути, нарушаемые при инфицировании клеток ГБ энтеровирусами, и оценили их роль для продуктивной вирусной инфекции.

Клеточные линии глиобластомы U-251MG и DBTRG-05MG, имеющие разный генотипический статус, инфицировали эховирусом 1-го типа, вирусом Коксаки B3 или полиовирусом 2-го типа. Метаболический профиль клеток анализировали с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Функциональную значимость выявленных метаболических изменений и их влияние на цитопатическое действие вирусов оценивали с использованием фармакологических ингибиторов метаболических ферментов. Уровни внутриклеточного пероксида водорода оценивали методом конфокальной микроскопии с применением генетически кодируемого сенсора HyPer7. Эксперименты проводили как в классической, так и в физиологической плазма-подобной среде для культивирования клеток.

Мы показали, что все три энтеровируса перестраивают процессы гликолиза, цикла Кребса, а также метаболизм полиаминов и пуринов. Характер изменений большинства метаболитов варьировал в зависимости от типа вируса, клеточной линии и, кроме того, существенно зависел от условий культивирования. Ингибирование митохондриального дыхания метформином и его аналогами, а также блокада пируватного транспортера ингибитором UK5099 и цистин-глутаматного антипортера сульфасалазином подавляли репликацию энтеровирусов. Напротив, ингибитор гликолиза 2-дезоксиглюкоза усиливал цитопатическое действие полиовируса. Все изученные энтеровирусы повышали уровни H_2O_2 в митохондриях и влияли на архитектуру митохондриальной сети.

Таким образом, мы показали, что энтеровирусы вмешиваются в клеточный метаболизм, создавая условия для своей успешной репродукции. Фармакологические ингибиторы митохондриального дыхания могут быть использованы как основа для противовирусной терапии в отношении энтеровирусов, тогда как 2-дезоксиглюкоза может применяться для усиления их цитопатического действия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-74-10092).

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ MKRN3 В ГИПОТАЛАМУСЕ МЫШИ

Иващенко М.В.[1,2*], Буев В.С.[2,3], Гусева Е.А.[2,3], Сергиев П.В.[2,3]

1. *Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия*
2. *Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия*
3. *Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия*

E-mail: mariya300303@gmail.com*

Убиквитин-протеасомная система (UPS) является ключевым механизмом посттрансляционной регуляции, контролирующим деградацию и активность белков (Komander & Rape, 2012). Среди компонентов UPS E3-убиквитинлигазы имеют особое значение, поскольку именно они определяют субстратную специфичность всей системы. Однако для многих E3-убиквитинлигаз молекулярные мишени и внутриклеточные функции остаются недостаточно изученными. Таким белком является MKRN3 (Makorin RING Finger Protein 3) – E3-убиквитинлигаза, экспрессирующаяся в гипоталамусе и выполняющая функцию супрессора полового созревания. Помимо RING-домена, отвечающего за убиквитинлигазную активность, MKRN3 содержит три цинковых пальца C3H-типа, что указывает на его возможную РНК-связывающую функцию. Мутации, приводящие к потере функции гена *MKRN3*, являются наиболее частой генетической причиной преждевременного полового развития у человека (Abreu et al., 2013).

Несмотря на установленную клиническую значимость, точные молекулярные механизмы, посредством которых MKRN3 регулирует время наступления половой зрелости, остаются мало изученными. Целью данной работы являлось исследование

функциональной роли MKRN3 в гипоталамусе мыши посредством анализа его белковых взаимодействий и идентификации потенциальных мишеней убиквитинирования.

При помощи коиммунопреципитации были идентифицированы белковые партнеры MKRN3, включая как прямые белок-белковые, так и РНК-опосредованные взаимодействия. Обнаруженные белки вовлечены в организацию цитоскелета, транспорт мРНК и контроль качества транскриптов – процессы, критически важные для нейрональной пластичности и дифференцировки.

Для определения мишеней убиквитинирования MKRN3 был проведен анализ убиквитин-ассоциированного протеома гипоталамуса мыши. Выявлен спектр белков, уровень убиквитинирования которых зависит от активности MKRN3. Эти белки вовлечены в регуляцию трансляции и котрансляционную транслокацию, что указывает на возможную роль MKRN3 в контроле синтеза и секреции ключевых нейропептидов.

Дополнительно был проанализирован убиквитилом мышей с делецией С-концевого фрагмента MKRN3. Выявлены белки с повышенным уровнем убиквитинирования по сравнению с мышами дикого типа, что свидетельствует о важности С-концевого фрагмента MKRN3 для узнавания субстратов убиквитинирования.

Таким образом, MKRN3 вовлечен в клеточные процессы, выходящие за рамки регуляции сроков полового созревания.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №24-14-00048).

ДЛИТЕЛЬНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МОДУЛИРУЕТ МЕТАБОЛИЗМ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК U87MG К ТЕРАПИИ

Исакова А.А.[1,2*], Дружкова И.Н.[3], Антипова Н.В.[2], Гаспарян М.Э.[2], Яголович А.В.[1]

1. *Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
2. *ФГБУН ГНЦ Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*
3. *ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия*

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

Опухолевые клеточные линии являются одним из основных инструментов доклинических исследований. Однако известно, что длительное культивирование клеток может сопровождаться накоплением фенотипических и метаболических изменений, способных существенно повлиять на результаты экспериментов. В работе исследовано влияние длительного пассирования на свойства клеточной линии U87MG, широко используемой в качестве *in vitro* модели глиобластомы человека. Показано, что клетки U87MG (L), культивируемые в течение более 20 пассажей, приобретают выраженные морфологические изменения, характеризуются накоплением липофусцина и повышением внутриклеточного уровня H_2O_2 по сравнению с клетками U87MG 4-5 пассажа, что свидетельствует о развитии окислительного стресса. Методом двухфотонной флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (FLIM) по аутофлуоресценции НАДН выявлен сдвиг клеточного метаболизма U87MG (L) в сторону гликолиза. В ортотопической модели в иммунодефицитных мышах ксенотрансплантаты U87MG (L) демонстрировали более агрессивный рост по сравнению с клетками U87MG 4-5 пассажа, диффузную инвазию в ткани мозга, инвазию в костную ткань и перineвральный рост.

Наряду с изменением фенотипа длительное пассирование существенно влияло на восприимчивость клеток к терапии. В сравнении с культурой U87MG, клетки U87MG (L) 20 пассажа приобретали устойчивость к темозоломиду. Однако, в них наблюдалось повышение экспрессии рецептора смерти DR5 и снижение экспрессии cFLIP, что обусловливало повышение чувствительности к клеточной гибели, индуцируемой DR5-селективным вариантом цитокина TRAIL.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что продолжительность культивирования является важным фактором, влияющим на метаболическое состояние клеточных линий и восприимчивость к лекарственному воздействию. При использовании клеточных линий в качестве моделей для оценки эффективности новых противоопухолевых препаратов следует контролировать количество пассажей и учитывать изменения, приобретаемые опухолевыми клетками в ходе длительного культивирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-14-00250).

КОНЪЮГАТЫ 3,5-БИСАРИЛИДЕН-4-ПИПЕРИДОНОВ С ДИХЛОРУКСУСНОЙ КИСЛОТОЙ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АГЕНТЫ

Карагодина С.А.[1], Брель В.К. [1], Александрова Ю.Р. [1], Шагина И.А. [1], Неганова М.Е. [1]

1. *Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия.*

E-mail: karagodina.sofi@yandex.ru*

На сегодняшний день онкологические заболевания являются одной из ведущих причин смертности в мире. Несмотря на значительные успехи в диагностике и терапии злокачественных новообразований, сохраняющиеся темпы заболеваемости и смертности делают проблему клинического контроля онкопатологий особо актуальной. Существующие препараты демонстрируют доказанную клиническую эффективность, однако их применение ограничено рядом проблем, включая возникновение лекарственной резистентности опухолевых клеток и системную токсичность. В связи с этим поиск новых эффективных лекарственных соединений остается приоритетной задачей современной медицинской химии.

В нашей работе был исследован цитотоксический потенциал производных 3,5-бисарилиден-4-пиперидона, которые позиционируются в качестве структурных аналогов природного полифенола куркумина - соединения с широким спектром биологической активности, в том числе противоопухолевой. Клиническое применение куркумина существенно ограничено низкой биодоступностью и быстрой метаболической деградацией, что делает создание синтетических аналогов с улучшенными свойствами рациональной стратегией для разработки высокоэффективных противоопухолевых агентов. Одним из наиболее изученных производных является EF-24, продемонстрировавший лучшую фармакологическую перспективность и доклиническую эффективность на ряде клеточных и животных моделях опухолей.

Таким образом, нами был получен ряд конъюгатов, сочетающих пиперидоновый фрагмент с различными заместителями, модифицированный дихлоруксусной кислотой. В in vitro серии экспериментов конъюгаты продемонстрировали значительно более высокую цитотоксичность в отношении клеточных линий опухолевого происхождения по сравнению с исходными пиперидонами и кукрумином. Исследование возможного механизма цитотоксического действия позволило обнаружить способность молекул индуцировать гибель клеток по пути митохондриально-зависимого апоптоза. Полученные данные указывают, что конъюгаты пиперидонов с дихлоруксусной кислотой представляют собой перспективные соединения с выраженным противоопухолевым потенциалом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-23-00810).

КИНЕТИКА КОМПАКТИЗАЦИИ ХРОМАТИНА НА ФОНЕ НОКАУТА КОГЕЗИНА

Коваленко А.Р.[1,2*], Казаков Е.П.[1,2], Киреев И.И.[1,2]

1. *НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Москва, Россия*
2. *Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: kovalenkonasta063@gmail.com*

SMC-комплексы (когезин, конденсины I и II) – ключевые архитектурные белки хроматина, организующие его за счёт АТФ-зависимой экструзии петель. В интерфазе когезин формирует топологически ассоциированные домены (ТАДы) и обеспечивает когезию сестринских хроматид начиная с S-фазы вплоть до анафазы митоза. Конденсины в митозе компактизуют хроматин в плотные хромосомы (Hoencamp и Rowland, 2023). Однако механизмы

взаимодействия конденсинов и когезинов при переходе к митозу остаются не до конца изученными. Целью данной работы стало исследовать кинетику митотической компактизации и оценить вклад когезина на ранних этапах этого процесса.

В работе использовалась клеточная линия HCT116, модифицированная ауксин-индуцибельным дегроном RAD21 субъединицы когезина. За 2 часа до индукции преждевременной конденсации хромосом (PCC) каликулином A добавляли ауксин. Репликативное мечение проводили EdU в течение 15 минут, затем фиксировали клетки через разные временные интервалы, причём каликулин A вносили за час до фиксации. Далее изготавливали хромосомные препараты по стандартной методике, детектировали EdU клик-химией, тотальную ДНК окрашивали DAPI. Изображения PCC получали на флуоресцентном микроскопе. Анализировали только PCC, находившиеся в S-фазе на момент индукции. Колокализацию в каналах EdU и DAPI оценивали по коэффициенту Мандерса в программе ImageJ.

В контрольных препаратах когезия между сестринскими хроматидами сохранялась, а после обработки ауксином наблюдалась потеря когезии, что подтверждает эффективность системы нокдауна. Анализ PCC показал, что колокализация сигналов EdU и DAPI повышается от момента мечения вплоть до 2 часов после введения метки. При нокдауне когезина значения коэффициента Мандерса через 1 и 2 часа были ниже контрольных, тогда как сразу после мечения и через 30 минут значимые отличия отсутствовали. Это свидетельствует о том, что когезин важен не на самых ранних, а на более поздних этапах уплотнения хроматина (в интервале 1–2 часа после репликативного мечения).

Выводы. 1) Максимальная степень компактизации реплицированного хроматина при индукции PCC достигается через 1 час после репликативного мечения. 2) Степень компактизации реплицированного хроматина при индукции PCC зависит от статуса когезина: через 1 и 2 часа после мечения степень компактизации при нокдауне когезина понижена.

Работа выполнена при финансовой поддержке Некоммерческого Фонда развития науки и образования «Интеллект».

РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В РЕГУЛЯЦИИ ПРОФИБРОТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПЛЕВРАЛЬНЫХ МЕЗОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Кузнецова Е.А.[1*], Бакаленко Н.И.[1], Атюков М.А.[2], Малашичева А.Б.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *СПБ ГБУЗ «ГМПБ № 2», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: evdu.kuznetsova@gmail.com*

Мезотелиальные клетки (МК) формируют монослой, выстилающий оболочки серозных полостей, принимают участие в процессах регенерации, воспаления, тканевого ремоделирования. При повреждении плевры МК способны претерпевать мезотелиально-мезенхимный переход (ММП), приобретая профибротический фенотип, характеризующийся избыточным синтезом компонентов внеклеточного матрикса, и вовлекая в патологическое ремоделирование легочные фибробласты, тем самым способствуя формированию плевральных сращений. Одним из потенциальных регуляторов этого процесса является сигнальный путь Notch, в настоящий момент его вклад в регуляцию характера ремоделирования тканей остается недостаточно изученным.

В работе использовались первичные культуры плевральных МК человека. МК трансдуцировали лентивирусными конструкциями, экспрессирующими внутриклеточные домены рецепторов Notch1–3 (N1ICD–N3ICD), для ингибирования — shRBPJ. В качестве известного профибротического стимула применяли TGF-β1. Для ингибирования сигнального пути TGF-β использовали селективный ингибитор киназной активности рецептора TGF-β I типа (ALK5) SB431542. Экспрессию генов, ассоциированных с ММП,

воспалением и профибротической трансформацией, анализировали методом количественной ПЦР, вестерн-блоттинга, иммуноцитохимического анализа.

Активация сигнального пути Notch приводила к приобретению МК миофибробластоподобного фенотипа. Наблюдалось повышение экспрессии генов *ACTA2* и *COL1A1*, а также экспрессии генов, ассоциированных с ММП — *SNAIL, SLUG*. Отмечалось повышение экспрессии *TGFB1* и снижение экспрессии *BMP4*. Подтверждение активации сигнального пути Notch наблюдалось по возрастанию экспрессии генов-мишеней *HEY1*, *HEYL* и *HES1*, а также лиганда *JAG1*. Действие shRBPJ сопровождалось снижением экспрессии *ACTA2*.

Иммуноцитохимический анализ показал наличие в клетках фибрилл αSMA, характерных для миофибробластов, как при стимуляции TGF-β1, так и при сверхэкспрессии N1ICD, N2ICD и N3ICD. При этом ингибирование TGF-β-сигналинга с помощью SB431542 не снижало индуцированную NICD экспрессию αSMA.

Таким образом, сигнальный путь Notch является важным регулятором клеточной пластичности мезотелиальных клеток и участвует в инициации их профибротической трансформации, что делает его перспективным объектом дальнейших исследований механизмов плеврального фиброза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-15-00126).

МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК ТРЕМАТОД И ХОЛАНГИОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА: РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ

Лишай Е.А.[1,2*], Фукс Э.С.[1,2], Пахарукова М.Ю.[2]

1. *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
2. *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

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

Экзосомо-подобные везикулы (ЭПВ) трематоды *Opisthorchis felineus* представляют собой консервативный механизм коммуникации, транспортирующий в том числе некодирующие РНК, которые потенциально способны регулировать экспрессию генов хозяина. Однако механизмы их влияния на клеточные процессы, в том числе на развитие неоплазии эпителия желчных протоков при описторхозе, остаются малоизученными.

Таким образом, целью работы было оценить состав малых РНК из ЭПВ и их функциональное воздействие на клетки эпителия желчных протоков — холангиоциты. Для этого были получены библиотеки малых РНК из ЭПВ и проведено секвенирование DNBSEQ 1X50 п.н. (BGI, Китай). Эксперименты *in vitro* проводили на клеточной культуре холангиоцитов человека линии H69.

В ЭПВ были обнаружены фрагменты РНК из митохондрий (1%), фрагменты тРНК (10%), микроРНК (1,8%) и фрагменты рРНК (1,6%).

Из описанных 109 зрелых микроРНК *O. felineus* в составе ЭПВ было обнаружено 97, среди которых наиболее представленными были Ofe-Mir-277-P2, Ofe-Mir-71-P1 и Ofe-Bantam. Среди выявленных микроРНК были как консервативные, то есть имеющие одинаковый участок для связывания у разных таксонов, так и неконсервативные последовательности. Для наиболее представленных микроРНК были предсказаны гены-мишени в геноме человека, которые относились к

путям эпителиально-мезенхимального перехода, регуляции актинового цитоскелета и PI3K-Akt сигнальному пути.

ЭПВ были обогащены фрагментами тРНК аспарагиновой кислоты, изолейцина, лизина, гистидина и тирозина, причем это обогащение не было связано с количеством копий генов тРНК в геноме трематоды или встречаемостью аминокислот в белках.

Для наиболее представленных фрагментов тРНК были предсказаны гены-мишени в геноме человека с помощью tRFtarget 2.0. При анализе транскриптома холангиоцитов после обработки ЭПВ наблюдали значимое обогащение генами-мишенями дифференциально экспрессирующихся генов.

Для оценки эффекта микроРНК на клетки проводили трансфекцию с использованием синтетических микроРНК-миметиков и ингибиторов. Ofe-miR-750, Ofe-miR-1993, Ofe-miR-92 и Ofe-miR-219 увеличивали уровень пролиферации холангиоцитов более чем в 1,5 раза (по тесту CCK-8). Ofe-miR-36-P1 значимо увеличивала миграцию холангиоцитов.

Полученные результаты расширяют представления о механизмах РНК-интерференции в межвидовых взаимоотношениях паразит-хозяин и важны для понимания молекулярного патогенеза описторхоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №26-14-00167).

ОЦЕНКА И ВАЛИДАЦИЯ РЕФЕРЕНС-ГЕНОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВОСТОЧНОАЗИАТСКОЙ ЛЕСНОЙ МЫШИ *APODEMUS PENINSULAE* (THOMAS, 1907) С ПОМОЩЬЮ ОТ-рвПЦР

Ляпунова Н.А.[1]*, Хаснатинов М.А. [1], Соловаров И.С. [1], Данчинова Г.А. [1], Болгова Е.К. [1], Подкаменная Н.А. [1], Хамнуева Н.В. [1], Васильева А.С. [1]

1. *ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия*

E-mail: nataly2193@mail.ru*

Apodemus peninsulae является резервуарным хозяином возбудителей нескольких природно-очаговых инфекций, в том числе вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). Для раскрытия механизмов взаимодействия хозяина и патогена на клеточном уровне необходимы исследования экспрессии генов мыши в ответ на инфекцию. Один из наиболее доступных, информативных и быстрых методов оценки экспрессии это ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-рвПЦР). Однако для получения надежных результатов требуется тщательный выбор референсных генов, стабильно работающих как в здоровых, так и в инфицированных клетках. Цель этой работы – оценка и валидация референсных генов для изучения экспрессии генов *A. peninsulae* в ответ на заражение ВКЭ.

Эксперименты проводили *in vitro* с использованием перевиваемой клеточной линии почки *A. peninsulae* (ApnK). Панель кандидатных референс-генов включала бета-актин (*ACTB)*, субъединицу А сукцинатдегидрогеназы (*SDHA*) и пептидилпролилцис-трансизомеразу А (*PPIA*). В качестве экспериментального маркера активации противовирусного иммунного ответа использовали ген бета-интерферона (*IFNB1*). РНК-транскрипты детектировали с помощью одностадийной ОТ-рвПЦР. Эксперимент проводили в трёх биологических повторах, каждый ПЦР-тест выполняли в трёх технических повторах. Стабильность экспрессии анализировали с помощью алгоритмов geNorm, NormFinder, BestKeeper и Delta-Ct.

Статистическую значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, а также однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки.
Комплексный анализ алгоритмами geNorm, NormFinder, BestKeeper и Delta-Ct с итоговым ранжированием RefFinder определили комбинацию *ACTB* и *SDHA* как наиболее стабильную для нормализации ОТ-рвПЦР. Для валидации референсных генов оценивали экспрессию *IFNB1*, которая впервые детектировалась через 24 ч (0,00012 отн. ед.), резко возрастала к 48 ч и достигала пика к 72 ч (2,1 отн. ед.). Кинетика экспрессии *IFNB1* в зараженных клетках соответствовала кинетике накопления инфекционного ВКЭ. Острая фаза инфекции ВКЭ в клетках *A. peninsulae* сопровождается индукцией гена *IFNB1* в течение первых 72 часов после заражения. Использование системы нормализации на основе генов *ACTB* и *SDHA* обеспечивает точность и воспроизводимость анализа динамики врожденного иммунитета в клетках *A. peninsulae*.

ДИНАМИКА И ЯДЕРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ C2H2-ЦИНК-ПАЛЬЦЕВЫХ БЕЛКОВ PITA И CG12391 НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В ЭМБРИОНАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Саллум Г.[1,2*], Максименко О.Г.[1], Георгиев П.Г.[1], Кудряшова К.С.[1]

1. *Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*
2. *Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия*

E-mail: sallum.g@phystech.edu*

Белки, содержащие домены цинковых пальцев C2H2-типа, такие как хорошо изученные dCTCF и Pita, традиционно рассматриваются как архитектурные факторы, участвующие в трехмерной организации генома и регуляции транскрипции. В течение клеточного цикла эти белки присутствуют в ядре постоянно: они детектируются сразу

после митоза и накапливаются на протяжении всей интерфазы, при этом их избыток образует характерные ядерные тельца, функциональная роль которых остаётся не до конца ясной. В отличие от них, белок CG12391, ранее не исследованный, демонстрирует принципиально иную динамику и паттерн распределения, что побудило нас провести его сравнительный анализ с Pita.

В данной работе мы использовали трансгенные линии *Drosophila melanogaster*, экспрессирующие CG12391 и Pita, слитые с флуоресцентными белками mCherry или mNeonGreen, под контролем промотора убиквитина-63E. С помощью прижизненной визуализации и иммуноокрашивания мы исследовали распределение CG12391 и Pita в ядрах в зависимости от стадии клеточного цикла.

Pita накапливается в интерфазе, формируя яркие ядерные тельца в интерхроматиновом пространстве, которые, по-видимому, представляют собой депо свободного белка; его поведение в этом смысле сходно с другими архитектурными белками. В отличие от Pita, динамика CG12391 существенно иная. Хотя в метафазных хромосомах он связан с конденсированным хроматином, сразу после деления он полностью исчезает из ядра — вероятно, за счет активного экспорта, — и вновь детектируется только в G2-фазе, когда геном уже реплицирован. Более того, в отличие от Pita, CG12391 не образует крупных агрегатов, но демонстрирует диффузное распределение, при этом иммуноокрашивание однозначно локализует его в зонах гетерохроматина (перекрывание с маркером H3K9me3).

Отсутствие агрегатов CG12391 и его строгая G2-специфичность указывают на участие в процессах, связанных с организацией реплицированного хроматина и подготовкой к митозу, а не на классическую функцию регуляции транскрипции и инсуляции, свойственную Pita.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-24-01040).

РОЛЬ КОНСЕРВАТИВНЫХ ОСТАТКОВ КАПСИДНОГО БЕЛКА P24 ВИЧ-1 В УСКОЛЬЗАНИИ ОТ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА

Машковская А.В.[1, 2, 3*], Дзюба М.А.[2, 3], Готтих М.Б.[2, 3], Анисенко А.Н.[1, 2, 3]

1. *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия*
2. *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия*
3. *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия*

E-mail: mashkovskayaav@my.msu.ru*

Вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1) обладает уникальной способностью уклоняться от внутриклеточного распознавания, что во многом определяет его эпидемическое распространение. Ключевую роль в этом играет капсид, защищающий кДНК ВИЧ-1 от цитозольных сенсоров ДНК и последующей активации внутриклеточных иммунных каскадов. Один из таких каскадов – это каскад cGAS-STING, активация которого на ВИЧ-1 значительно снижена по сравнению с другими лентивирусами. Капсид собран из белка p24, организованного в гексамеры и пентамеры. Большинство аминокислотных остатков p24 высококонсервативны, а формируемые ими межмолекулярные контакты определяют оптимальную стабильность. Терапевтический потенциал воздействия на капсид ВИЧ-1 подтверждается на примере ленакапавира, первого антиретровирусного препарата из класса ингибиторов разборки капсида.

В результате работы была изучена роль 20 отдельных консервативных остатков p24 в жизненном цикле вируса и в ускользании от внутриклеточного распознавания. Были получены VSV-псевдотипированные псевдовирусные частицы с заменами

выбранных остатков p24 на аланин. Для каждого мутанта оценивали эффективность сборки, уровень обратной транскрипции, ядерный импорт и выработку интерферонов по STING-зависимому пути.

Большинство замен в интерфейсных остатках негативно сказывалось на сборке, что подтверждалось снижением количества p24 и вирусной РНК в итоговых препаратах. Практически все мутации снижали инфекционность и одновременно повышали выработку интерферонов, причём между этими параметрами наблюдалась выраженная обратная корреляция: чем ниже инфекционность, тем сильнее активировался каскад STING. Наиболее сильное влияние на инфекционность и стимуляцию интерферонового ответа оказывали замены в N-концевом домене белка p24. Именно N-концевой домен p24 преимущественно участвует в формировании гексамера, структурной единицы капсида, что подчеркивает важность структурной целостности капсида ВИЧ-1 в защите от внутриклеточного распознавания.

Полученные данные раскрывают структурные основы иммунного ускользания ВИЧ-1, демонстрируя критическую значимость N-концевого домена капсида и корреляцию между нарушением сборки, снижением инфекционности и активацией врождённого иммунитета.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-14-00110).

РОЛЬ МИКРОРНК ЭКЗОСОМО-ПОДОБНЫХ ВЕЗИКУЛ ТРЕМАТОДЫ *OPISTHORCHIS FELINEUS* В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ХОЗЯИНА

Медведева Е.В.[1*], Лишай Е.А.[1,2], Пахарукова М.Ю.[1]

1. *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*
2. *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

E-mail: ekav.medvedeva@gmail.com*

МикроРНК — малые некодирующие РНК длиной около 22 нуклеотидов, подавляющие экспрессию генов-мишеней на посттранскрипционном уровне. МикроРНК способны транспортироваться внеклеточными везикулами и участвовать в межклеточной коммуникации. Однако, их роль во взаимоотношениях между разными видами, в том числе в системе «паразит — хозяин», остаётся малоизученной, в частности, для трематоды *Opisthorchis felineus*, эпидемиологически значимого и длительно коэволюционировавшего паразита человека и других млекопитающих. Мало известно о механизмах, лежащих в основе модуляции иммунного ответа хозяина при инвазии *O. felineus*. Мы предположили, что микроРНК экзосомо-подобных везикул трематоды могут участвовать в иммунорегуляции, воздействуя на макрофаги человека.

Цель работы — изучение влияния экзосомо-подобных везикул *O. felineus* и транспортируемых ими микроРНК на поляризационный ответ макрофагов человека.

В качестве клеточных моделей использовали первичные макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови человека, и иммортализованную линию моноцитов человека THP-1. Интернализацию в клетки флуоресцентно-меченых везикул и микроРНК подтверждали методами флуоресцентной и конфокальной микроскопии, а также РНК-гибридизацией *in situ*. Для наиболее представленных микроРНК экзосомо-подобных везикул

предсказаны гены-мишени. Выполнен транскриптомный анализ моноцитов THP-1, активированных до макрофаго-подобных клеток и обработанных экзосомо-подобными везикулами: среди дифференциально экспрессирующихся генов наблюдали обогащение по путям, связанным с иммунологическими процессами, клеточным циклом и клеточной гибелью, а также значимое обогащение генами-мишенями микроРНК. Поляризацию макрофагов оценивали методом ПЦР в реальном времени по экспрессии маркеров M1 и M2 фенотипов. Трансфекция клеток синтетическими микроРНК-миметиками и ингибиторами позволила выявить последовательности, влияющие на M1-поляризацию (Ofe-miR-1993, Ofe-miR-277, Ofe-miR-279, Ofe-miR-219, Ofe-miR-750, Ofe-let-7, Ofe-novel-2) и M2-поляризацию макрофагов (Ofe-miR-277, Ofe-miR-279, Ofe-novel-2, Ofe-miR-1993).

Таким образом, показана роль экзосомо-подобных везикул и микроРНК трематоды *O. felineus* в регуляции макрофагов человека, что открывает новые перспективы в изучении иммуномодулирующих механизмов описторхоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №26-14-00167).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ И СЕКРЕЦИИ ЛИГАНДА РЕЦЕПТОРА ЭФР АМФИРЕГУЛИНА В ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Дзюмина Н.Н.[1,3*], Котов М.А. [2], Харченко М.В.[3], Каменцева Р.С.[3], Корнилова Е.С. [1,2,3]

1. *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*
3. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: nikadzyumina@gmail.com*

Высокий процент неудач ЭКО с эмбрионами высокого качества указывает, что для имплантации и развития беременности важно состояние эндометрия. Для изучения молекулярных основ имплантации применяются неинвазивные клеточные модели — мезенхимальные стромальные клетки из менструальной крови (энМСК). В рецептивность эндометрия вовлечены лиганд-рецепторные взаимодействия, в том числе рецептора EGF и его лиганды AREG и HB-EGF. Данные по человеку пока ограничены, но исследования на мышах подтверждают, что синтез и секреция AREG в эндометрии важны для адгезии бластоцисты. Экспрессия рецептора EGF, его лигандов и активность MMP, отвечающей за их высвобождение, регулируются эстрогеном, прогестероном и гистамином, что указывает на изменения концентрации этих белков в цикле. Цель работы — исследовать экспрессию и секрецию амфирегулина (AREG) в эндометриальных мезенхимных стромальных клетках человека.

Материал: энМСК 2804, первичные эндометриальные клетки 2-го пассажа из менструальной крови, МСК из пульпы зуба (DP), HeLa, MCF7. Методы: проточная цитометрия, ИФА, полуколичественная

ПЦР-RT, вестернблоттинг, культивирование с ингибиторами (тамоксифен, фамотидин), стимуляция децидуализации.

Методом ПЦР доказана экспрессия мРНК AREG во всех линиях. При культивировании с рекомбинантным AREG (20 нМ) пролиферативный ответ наблюдался у HeLa и MSC-DP, но не у энМСК, и этот ответ не коррелировал с уровнем мРНК. Иммуноблоттинг показал сопоставимый синтез белка AREG во всех линиях, однако ИФА кондиционированной среды выявил секрецию только у MCF7 и энМСК, тогда как у HeLa и MSC DP она отсутствовала. Таким образом, именно интенсивность секреции AREG определяет чувствительность клеток к экзогенному лиганду. При анализе децидуальной дифференцировки использование цАМФ существенно подавляет секрецию AREG, тогда как гормональная стимуляция (эстроген и прогестерон) сохраняет её уровень. Изучено влияние тамоксифена и фамотидина: тамоксифен, применяемый для коррекции тонкого эндометрия в протоколах ЭКО, значительно снижает как экспрессию мРНК, так и секрецию AREG; фамотидин (ингибитор H2-рецептора) также снижает секрецию AREG, подтверждая роль гистаминовой сигнализации на начальных этапах имплантации.

Вывод: синтез и секреция AREG в эндометрии регулируются эстрогеновыми и гистаминовыми рецепторами и цАМФ-зависимыми путями. Эти закономерности расширяют панель маркеров рецептивности и способствуют разработке персонализированных протоколов подготовки к имплантации.

ИМПОРТ И ЭКСПОРТ МЕТАБОЛИТОВ КЛЕТКАМИ ПЕЧЕНИ ПРИ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С

Моргунова В.А.[1,2*], Зенов М.А.[1,2], Иванов А.В.[1,3]

1. *ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН», Москва, Россия*
2. *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
3. *НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России*

E-mail: morgunova.03@inbox.ru*

Хроническая инфекция вирусом гепатита С (ВГС) выявлена примерно у 50 млн человек в мире. Она может приводить к фиброзу, циррозу и раку печени. Патогенез инфекции ВГС связан в том числе с перепрограммированием клеточных сигнальных и метаболических путей (Lévy P., Bartosch B., 2016). Известно, что ВГС увеличивает накопление триглицеридов в гепатоцитах, вызывая стеатоз у пациентов, а развитие фиброза связано с продукцией цитокинов гепатоцитами и клетками Купфера (Negro F, 2006). При этом, неизвестным является участие обмена метаболитами между гепатоцитами и непаренхимными клетками печени в развитии патологий при ХГС.

Цель данной работы – установление изменений экспорта/импорта метаболитов гепатоцитами при инфекции ВГС. Моделью инфекции являлись клетки гепатокарциномы Huh7.5, которые заражали вирусом изолята JFH1. Динамику инфекции оценивали ОТ-ПЦР в реальном времени и иммуноцитохимическим окрашиванием клеток. Метаболомный анализ кондиционной среды проводился газовой хроматографией с масс-спектрометрическим анализом веществ.

Выяснено, что инфицированные клетки Huh7.5 активнее секретируют лактат, аланин и пролин на фоне усиленного потребления глюкозы и таких аминокислот, как глутамин, серин, треонин, тирозин и некоторых других. Для оценки возможной роли метаболитов в межклеточных взаимодействиях исследовано потребление и секреция метаболитов стеллатными клетками печени

человека линии LX-2 – предшественниками миофибробластов и участниками фиброгенеза. Были установлены секреция глутамата (что указывает на активацию глутаминолиза), лактата, аланина и пролина, а также поглощение аспарагина, который может быть использован клетками для синтеза нуклеотидов.
Результаты работы дают основание для изучения роли лактата и секретируемых аминокислот в патогенезе инфекции ВГС.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №25-24-00536).

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНА CCL20 ПРИ ВПЧ-ИНФЕКЦИИ

Музлаева Е.С.[1*], Машкина Е.В[1]

1. *ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия*

E-mail: muzlaeva.dora@gmail.com*

Вирус папилломы человека (ВПЧ) вызывает около 4,5% всех случаев рака у человека (Sung, 2021). Канцерогенность ВПЧ наиболее убедительно установлена в случае рака шейки матки – 70-90 % случаев (Файзулоев, 2021). Одной из причин инвазивного рака на фоне ВПЧ считается его персистенция, которая может возникать из-за уклонения вируса от иммунного ответа за счёт изменения механизмов презентации антигенов. *CCL20* – это ген белка хемокинового ряда, привлекающий клетки Лангерганса – основные антигенпрезентирующие клетки при ВПЧ-инфекции (Rios-Yuil, 2014). Таким образом функционирование CCL20 играет важную роль в процессе хемотаксиса и иммунного ответа.
Целью исследования – изучить влияние транскрипции, метилирования и полиморфизма *CCL20* на формирование высокой вирусной нагрузки при ВПЧ-инфекции.

Материалом для исследования послужили образцы РНК и ДНК, выделенные из клеток эпителия цервикального канала женщин репродуктивного возраста (старше 30 лет). В исследовании выделены две группы женщин: контроль (ВПЧ-) и ВПЧ+ с вирусной нагрузкой > 3 lg.

Для проведения анализа уровня экспрессии использовали обратную транскрипцию с последующей ПЦР кДНК в реальном времени со специфичными флуоресцентными зондами.

Для генотипирования *CCL20* (rs6749704) применяли метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Оценку метилирования гена проводили с помощью метилспецифичной ПЦР с двумя видами праймеров.

Изученный полиморфизм *CCL20* не является генетическим фактором предрасположенности к формированию высокой вирусной нагрузки при ВПЧ-инфекции: распределение частот генотипов и аллелей не различается между контрольной группой и группой ВПЧ+, а также уровень вирусной нагрузки не зависит от генотипа ($p = 0,128$).

Высокая вирусная нагрузка ВПЧ ассоциирована с выраженным гипометилированием гена CCL20: медиана метилирования в группе ВПЧ+ более чем в 2,5 раза ниже, чем в контроле ($p < 0,001$), при этом возраст пациенток не влияет на эпигенетический статус ($p = 0,975$).

Транскрипционная активность CCL20 не изменяется при высокой вирусной нагрузке ВПЧ ($p = 0,919$). В контрольной группе выявлена значимая отрицательная корреляция между метилированием и экспрессией ($p = 0,04$), тогда как в группе ВПЧ+ эта связь полностью отсутствует ($p=0,687$), что указывает на нарушение эпигенетической регуляции гена при ВПЧ-инфекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности (проект № FENW-2026-0030).

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ПОГРАНИЧНОГО БУЛЛЕЗНОГО ЭПИДЕРМОЛИЗА В ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ КЕРАТИНОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/eCas12f1

Науменко К.А.[1,2*], Подмосковников Г.С.[1], Алексеева М. М.[1], Мартынова А.А. [1], Степанов А. И. [1], Шептий В.В.[3], Гурская Н.Г.[1]

1. *ФГАОУ ВО «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия*
3. *Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия*

E-mail: kirllnaumenko@yandex.ru*

Пограничный буллезный эпидермолиз - наследственное заболевание, обусловленное нарушением структуры базальной мембраны кожи. Более чем в 70% случаев заболевания выявляются патогенные варианты гена *LAMB3*, кодирующего β3-субъединицу ламинина-332, критически важного для адгезии кератиноцитов (Has et al., 2020; Fine et al., 2014). Разработка генно-модифицированных препаратов требует создания клеточных моделей, воспроизводящих отсутствие экспрессии *LAMB3*. Целью работы является получение клеточной модели с нокаутом гена *LAMB3* в клеточной линии HaCaT RT3 для последующего тестирования подходов генной терапии. Для нокаута использовали систему CRISPR/eCas12f1 (e – enhanced), содержащую улучшенную версию гиперкомпактной программируемой нуклеазы Cas12f1, обеспечивающей высокую эффективность и специфичность редактирования генома (Kim et al., 2022; Cui et al.,2024) Доставка компонентов системы редактирования в клетки проводилась с помощью адено ассоциированного вируса серотипа DJ. После селекции клонов и секвенирования произвели оценку уровня экспрессии *LAMB3*.

Полученная модель позволит исследовать эффективность генно-модифицированных препаратов, направленных на восстановление функции *LAMB3*, а также стандартизировать доклиническую оценку перспективных терапевтических подходов при пограничном буллезном эпидермолизе.

Исследование выполнено при поддержке Программы развития ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет) в рамках программы «Приоритет-2030».

РАСШИРЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,3,4-ДИТИАДИАЗОЛА КАК МОДУЛЯТОРОВ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

Новикова Ю.В.[1*], Куровский Е.Б.[1], Григорьева Е.Р.[1], Колесников Д.О.[1], Юсковец В.Н.[2], Чернов Н. М.[2], Яковлев И.П.[2], Вигонт В.А.[1], Казначеева Е В.[1], Грехнев Д.А.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: miyorene@yandex.ru*

Депо-управляемый вход кальция (store-operated calcium entry, SOCE) является ключевым механизмом поддержания кальциевого гомеостаза (Hogan et al., 2015). Нарушения этого пути выявлены при аутоиммунных, воспалительных, онкологических и нейродегенеративных заболеваниях (Kappel et al., 2019), что определяет актуальность поиска модуляторов SOCE. Ранее нами был описан новый класс ингибиторов SOCE — производные 1,2,3,4-дитиадиазола (Grekhnev et al., 2022; Novikova et al., 2024). Анализ структурных аналогов показал, что наиболее выраженная

активность характерна для соединений с сильными электроноакцепторными заместителями в одном из бензольных колец. Однако наиболее активные представители также снижали содержание кальция в эндоплазматическом ретикулуме (ER), что указывало на ограниченную селективность их действия.

Цель работы — структурная оптимизация наиболее эффективных производных 1,2,3,4-дитиадиазола для получения пула структурных аналогов, которые избирательно ингибируют SOCE, почти не влияя на содержание кальция в ER. В рамках структурной оптимизации в молекулы двух лидирующих соединений был введен дополнительный электроноакцепторный заместитель во второе бензольное кольцо. Для оценки активности соединений использовали флуоресцентные кальциевые зонды Fluo-4AM и Fura-2AM, генетически кодируемый кальциевый сенсор ER, patch-clamp и конфокальную микроскопию.

Функциональный анализ показал, что новые производные сохраняют способность подавлять SOCE. При этом их влияние на кальциевый контент ER было значительно снижено по сравнению с исходными соединениями, что свидетельствует о повышении селективности в отношении депо-управляемых кальциевых каналов. Электрофизиологические эксперименты подтвердили ингибирование токов через SOC. Кроме того, методом конфокальной микроскопии показано подавление NFAT-зависимого сигнального пути: новые производные снижали транслокацию NFAT в ядро, активация которой инициируется SOCE.

Таким образом, среди производных 1,2,3,4-дитиадиазола выделены две функционально различающиеся группы: ингибиторы, одновременно подавляющие SOCE и уменьшающие содержание кальция в ER, и более селективные ингибиторы SOCE без значимого влияния на кальциевый контент ER. Эти аналоги 1,2,3,4-дитиадиазольного скаффолда могут использоваться как молекулярные инструменты для исследования кальциевой сигнализации и основа для разработки новых фармакологических модуляторов SOCE.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-75-00103).

МОДУЛЯЦИЯ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА В ЭНДОТЕЛИОЦИТАХ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ В УСЛОВИЯХ МЕЛАНОМЫ КОЖИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХЛОРОХИНА

Обанина Н.А.[1*], Бгатова Н.П.[1]

1. *Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН), Новосибирск, Россия*

E-mail: obaninana@bionet.nsc.ru*

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) обеспечивает гомеостаз мозга, защищая нейроны от токсинов и системных колебаний. При периферическом опухолевом росте воспаление и опухолевые факторы могут нарушать проницаемость ГЭБ, способствуя нейрональной дисфункции. Ключевым механизмом регуляции проницаемости является трансэндотелиальный везикулярный транспорт. Хлорохин (CQ) является лизосомотропным агентом, повышающим pH поздних эндосом и лизосом и нарушающим эндосомально-лизосомальный трафик. Его влияние на ультраструктуру эндотелиоцитов префронтальной коры при опухолевом росте не изучено.

Цель. Оценить ультраструктурные изменения эндотелиоцитов капилляров префронтальной коры при периферическом опухолевом росте и применении хлорохина.

Исследование проведено на мышах-самцах линии C57BL/6 в 4 группах (n=8/группа): Контроль, Контроль + CQ, Опухоль и Опухоль + CQ. Клетки меланомы B16 вводили подкожно в паховую область в дозе $1{,}0\times10^6$. С 10 дня после инокуляции опухолевых клеток начали ежедневное введение хлорохина перорально (80 мг/кг

7 дней). Далее производили забор фрагментов префронтальной коры. Образцы фиксировали в 4% растворе параформальдегида и 1% OsO_4, обезвоживали и заливали эпоном (Serva, Германия). Микрофотографии получали с помощью электронного микроскопа JEM 1400 (JEOL, Япония). Морфометрический анализ эндотелиоцитов капилляров префронтальной коры: объёмной плотности люминальных и базальных кавеол, свободных транспортных везикул выполняли с помощью ImageJ. Статистическая обработка данных выполнена с использованием U-критерия Манна–Уитни ($p < 0,05$).

В группе Опухоль отмечали повышенное содержание свободных транспортных везикул ($p = 0,0076$). В группе Опухоль + CQ наблюдали достоверное их снижение до контрольных значений ($p < 0,05$). Периферическая опухоль, вероятно, запускает сигнальные каскады, усиливающие трансцитоз и повышающие проницаемость ГЭБ. Хлорохин, нарушая эндосомально-лизосомальный трафик, повышая pH эндосом и нарушая слияние мембран, блокирует этот индуцированный опухолью процесс.

При периферическом опухолевом росте увеличивается плотность транспортных везикул в эндотелиоцитах капилляров ГЭБ. При применении хлорохина объёмная плотность везикул не отличается от контроля, что указывает на подавление патологического опухоль-ассоциированного трансцитоза, не влияя на базальный уровень везикулярного обмена.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН (№ FWNR-2025-0015).

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ХАНТИНГТОНА: НАРУШЕНИЯ БИОГЕНЕЗА РИБОСОМ, ПРОТЕОСТАЗА, ЦИТОСКЕЛЕТА И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА

Парфенова П.С.[1*], Кочиев Д.А.[3], Репкин Е.А.[2], Михайлова Н.А.[1], Красковская Н.А.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия*
3. *Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: sucrederaisin@incras.ru*

Болезнь Хантингтона (БХ) представляет собой нейродегенеративное доминантно наследуемое заболевание, клиническая выраженность которого коррелирует с длиной полиглутаминового тракта (polyQ) в первом экзоне гена HTT. При числе CAG-повторов выше порогового значения (36 триплетов) синтезируемый белок хантингтин (HTT) благодаря удлинённому polyQ-участку приобретает цитотоксические свойства. При этом, хотя агрегация и гибель клеток в присутствии mHTT описаны преимущественно для нейрональной ткани, синтез mHTT происходит и в других типах клеток человека, включая дермальные фибробласты. Это делает последние доступным и малоинвазивным объектом для изучения патогенных эффектов mHTT в клетках человека.

Для понимания молекулярных взаимодействий mHTT и сопутствующих метаболических сдвигов мы выполнили протеомный анализ трёх пар линий дермальных фибробластов, полученных из биоптатов пациентов с БХ, и соответствующих им по полу и возрасту контрольных линий здоровых доноров. Методом главных компонент (PCA) мы отобрали 171 белок, вносящий наибольший вклад в разделение первых двух компонент и

демонстрирующий согласованное направление изменений во всех трёх парах клеточных линий. Анализ дифференциально экспрессируемых белков (ДЭБ), согласованно изменённых во всех трёх парах клеток («БХ – контроль»), выявил разнонаправленную регуляцию шаперонов: повышение одних представителей семейства на фоне снижения других. Это может свидетельствовать как о компенсаторном механизме, так и об истощении ресурса шаперонной системы в условиях хронической экспозиции mHTT. Кроме того, анализ ДЭБ продемонстрировал повышение уровней белков цитоскелета и аксонального транспорта (MAP1B, ROCK2, NSF и др.), что может отражать компенсаторную перестройку транспортных путей клетки в ответ на характерную для БХ дисфункцию везикулярного транспорта. Наконец, изменения затронули биогенез рибосом и процессинг РНК: снижены уровни компонентов рибосомного биогенеза и РНК-связывающего белка HNRNPA1 – известного интерактора HTT, участвующего в регуляции сплайсинга. Это согласуется с ранее описанными при БХ нарушениями трансляции и процессинга пре-мРНК, подтверждая системный характер транскрипционно-трансляционного дисбаланса в фибробластах пациентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРК (проект № 075-15-2025-482).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ МАШИННОГО ЗРЕНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА ДИНАМИКИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА МИТОХОНДРИЙ

Паско В. И.[1,2*], Шахов А. С.[2], Чуркина А. С.[2], Беликова Л.Д.[3], Лаврушкина С.В.[2], Котлобай А.А.[3,4], Лагарькова М.А.[3,4], Алиева И. Б.[2]

1. *Факультет Биоинженерии и Биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
2. *НИИ Физико-Химической Биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
3. *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина, Москва, Россия*
4. *Центр «Генетическое репрограммирование и генная терапия», Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина, Москва, Россия*

E-mail: paskoslava2001@yandex.ru*

Митохондриальный стресс, избыточное образование АФК и ассоциированная с ними патологическая клеточная гибель присущи широкому спектру нейродегенеративных расстройств, к которым относится болезнь Гентингтона. В контексте данного заболевания, наблюдаемые явления могут быть объяснены воздействием мутантного гентингтина на транспортные комплексы цитоскелета. Прижизненное наблюдение внутриклеточной динамики митохондрий необходимо для анализа влияния мутантного гентингтина на внутриклеточный транспорт, при этом основным ограничением данного подхода является необходимость обрабатывать большие объемы визуальной информации. Существующие методы автоматического анализа подвержены риску ложных положительных измерений, а также затруднительны для работы с объектами, имеющими сложную морфологию, в особенности – с митохондриями. Одним из возможных решений данной проблемы представляется создание инструментов на основе методов машинного обучения. Помимо высокой скорости обработки

информации, постоянной точности измерения и нечувствительности к шуму, они позволяют прогнозировать скорость, направленность движения и поведение детектируемого объекта в целом, а также могут быть обучены и адаптированы к конкретным задачам с использованием данных, полученных в ходе ранее выполненных экспериментов. Модель, полученная в ходе выполнения данной работы, демонстрирует точность детектирования митохондрий, не уступающую ручному анализу, и значительно превосходит его по производительности. Также, модель выделила три паттерна подвижности митохондрий: ненаправленно, диффузно и направленно движущиеся митохондрии.

Полученные данные свидетельствуют о снижении направленности движения митохондрий при болезни Гентингтона. Вероятной причиной этого явления служит негативное воздействие мутантного гентингтина на структурную целостность митохондрий, элементы цитоскелета и связанные с ними моторные и регуляторные комплексы; это приводит к усилению хаотичности перемещения митохондрий и одновременно к снижению средней наблюдаемой скорости их движения вследствие фрагментации митохондрий и активации компенсаторных механизмов.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова. Исследование поддержано Программой развития МГУ имени М.В. Ломоносова (PNR 5.13).

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЯДЕРНЫХ СТРЕСС ТЕЛЕЦ В КЛЕТКАХ МИЕЛОИДНОГО РЯДА ПРИ ТЕПЛОВОМ ШОКЕ

Пономарцев Н.В.[1*], Острова М.М.[1], Енукашвили Н.И.[1]

1. *ФГБУН «Институт Цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: ponomartsev@yandex.ru*

Тепловой шок вызывает активацию транскрипционного фактора HSF1, который наряду с индукцией генов ответа на стресс активирует транскрипцию ряда некодирующих повторяющихся последовательностей генома, среди которых в клеточных линиях человека наиболее интенсивно транскрибируется перицентромерный сателлит 3 (HSAT3). Накопление транскриптов HSAT3 сопровождается формированием ядерных стресс телец (ЯСт) — динамических компартментов ядра, участвующих в регуляции ответа клетки на стресс. Несмотря на детальное изучение этого процесса в эпителиальных клетках, его особенности в клетках миелоидного происхождения недостаточно исследованы.

Цель работы: сравнение стресс-индуцированной активации транскрипции HSAT3 и формирования ЯСт в клеточных линиях эпителиального и миелоидного происхождения.

В работе использовали эпителиальные клеточные линии A549 и линии миелоидного происхождения THP-1 и U937, а также клетки THP-1, дифференцированные в M0 и поляризованные в M1-подобные макрофаги. Клетки подвергали гипертермии при 39.5, 42 и 45°C в течение 1 ч. Активацию ответа клетки на тепловой шок оценивали по уровню активной фосфорилированной формы HSF1 и экспрессии гена *HSPA1A*. Транскрипцию HSAT3 анализировали методом кПЦР. Пространственную локализацию HSAT3 и HSF1 исследовали методом РНК-FISH в сочетании с иммунофлуоресцентным анализом.

Во всех исследованных клеточных моделях тепловой шок сопровождался активацией HSF1 и индукцией экспрессии *HSPA1A*.

В клетках A549 наблюдалась выраженная активация транскрипции HSAT3 с максимумом при 42°C, сопровождавшаяся формированием крупных HSAT3-положительных ядерных фокусов, колокализующихся с HSF1, что соответствует классическим ЯСт. Напротив, в клетках THP-1 и U937 после теплового шока (42°C), несмотря на активацию HSF1, значимого увеличения уровня HSAT3 транскрипта и его колокализации с HSF1 не выявлено. В отличие от недифференцированных THP-1, как M0-, так и M1-подобные макрофаги приобретали способность к стресс-индуцированной транскрипции HSAT3, сопровождавшейся формированием ЯСт.
Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация HSF1 сама по себе недостаточна для стресс-индуцированной транскрипции HSAT3 и формирования ЯСт. Способность клеточных линий миелоидного ряда к образованию ЯСт приобретается в процессе макрофагальной дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-24-01068).

ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ DOWNSTREAM SEQUENCE ELEMENT НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ EGFP В КЛЕТКАХ CHO-S

Посаженников М.А.[1,2*], Летягина А.Е.[1], Андреева Е.Н.[1], Омелина Е.С.[1]

1. *ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», Новосибирск, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия*

E-mail: posazhennikov@mcb.nsc.ru*

При разработке генетической конструкции для продукции рекомбинантного белка наибольшее внимание, как правило, уделяется выбору оптимальных промотора, энхансера и последовательностей, повышающих эффективность трансляции. Терминаторы транскрипции крайне редко рассматриваются в качестве элементов, способных значительно влиять на уровень экспрессии целевого гена. Репертуар терминаторов транскрипции, применяемых в биотехнологии, чрезвычайно ограничен: терминатор гена бычьего гормона роста (*bGH*), ранний или поздний терминатор вируса SV40, терминатор гена β-глобина кролика или человека, синтетический терминатор транскрипции (Levitt et al., 1989), а также их комбинации. Исследования, проведенные за последние 17 лет показали, что последовательность терминатора транскрипции обладает значительным регуляторным потенциалом.

Терминация транскрипции РНК-полимеразы II тесно связана с процессингом 3'-конца пре-мРНК, который заключается в разрезании и полиаденилировании транскрипта. Одну из ключевых ролей в этом процессе играет последовательность, расположенная ниже сайта полиаденилирования – Downstream sequence element (DSE). Это U/GU-богатая последовательность, которая распознается комплексом CstF и не входит в состав зрелой мРНК.

Ранее в нашей лаборатории методом массового параллельного репортерного анализа было исследовано влияние более 200 тысяч

последовательностей DSE на уровень мРНК репортерного гена eGFP в культивируемых клетках человека HEK293T (Omelina et al., 2022). На основе этих данных были разработаны последовательности DSE High 1 и High 2, повышающие количество зрелой мРНК и белка eGFP, а также DSE Low 1, снижающая количество зрелой мРНК и белка eGFP.

В данной работе было показано, что изменение последовательности, расположенной ниже сайта полиаденилирования, позволяет варьировать количество мРНК и белка eGFP в 15 и 34 раза соответственно при эписомальной экспрессии в клетках CHO-S. Терминаторы транскрипции с последовательностями High 1 и High2 обеспечивают более высокий уровень белка eGFP по сравнению с широко используемым терминатором транскрипции гена *bGH*. Инвертирование последовательностей High 1 и High 2 приводит к изменению их активности, что свидетельствует об их функционировании на уровне РНК. U-состав последовательности DSE коррелирует с уровнем экспрессии eGFP. Мы предполагаем, что последовательность, расположенная ниже сайта полиаденилирования, влияет на эффективность разрезания и полиаденилирования мРНК.

БИОХИМИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ В СВЯЗИ С МОРФОЛОГИЕЙ И ПОКАЗАТЕЛЯМИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ НАТИВНЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Притужалова А.О.[1*], Курочкин А.А.[1], Кузьмина Т.И. [1], Денисенко В.Ю. [1], Баранова Е.И. [1]

1. *Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», Санкт-Петербург, Пушкин, Россия*

E-mail: aklevakina14@mail.ru*

Низкая фертильность спермы быков - один из негативных факторов, ограничивающих разведение крупного рогатого скота. Цель настоящего исследования – оценить биохимический профиль быков производителей (глюкоза, холестерин, кальций, натрий, фосфор) в связи с морфологическими показателями (общая и прогрессивная подвижность, малоподвижные сперматозоиды с прямолинейным движением), показателями жизнеспособности и морфофункциональной активности клеток (генерация АФК, уровень цитозольного Ca^{2+}, мембранный потенциал митохондрий - $\Delta\psi$). Каждый эякулят из 10 быков-производителей голштинской породы (2-5 лет) делили на 3 аликвоты: 1 – нативный эякулят (500 мкл) инкубировали 10 мин. при +37 °С, центрифугировали (2700 об/мин 8 мин.), супернатант отбирали и центрифугировали еще 15 мин. при 8000 об/мин. Полученную семенную плазму (СП) в криопробирках хранили при -80°С. Биохимический анализ проводили на автоматическом анализаторе VitaLine-200 (Vital Development, Россия, наборы Vital) в соответствии с рекомендациями производителя. 2 – подвижность разбавленного нативного семени (10 мкл) оценивали с помощью компьютерной системы MMSsperm в камере Маклера. 3 – нативный эякулят (30 мкл) дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере, оценивали жизнеспособность

(пропидия йодид), генерацию АФК в клетках (2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат), Δψ (тетраметилродамин), содержание цитозольного Ca^{2+} (Fluo3-AM, проточный цитофлуориметр, программное обеспечение CytExpert, Version 2.4.0.28, Beckman Coulter Inc., США). Отрицательная корреляция выявлена между уровнем содержания холестерина в СП и показателями прогрессивной подвижности гамет (-0,77, $p<0,05$), процентом жизнеспособных сперматозоидов с низкой генерацией АФК в клетках (-0,78, $p<0,05$), а также долей клеток с высоким Δψ. Обнаружена положительная корреляция между содержанием холестерина и уровнем кальция в СП (0,76, $p<0,05$). Уровень содержания кальция в СП имел отрицательную корреляцию с показателем прогрессивной подвижности (-0,88, $p<0,01$). Положительная корреляция выявлена между уровнями жизнеспособных клеток с низкой генерацией АФК и жизнеспособных клеток с высоким содержанием цитозольного Ca^{2+} (0,86, $p<0,05$). Результаты комплексного мониторинга биохимического статуса семенной жидкости, показателей жизнеспособности и функциональной активности мужских гамет дополняют имеющиеся знания функционирования репродуктивной функции самцов *Bos Taurus* и могут использоваться для идентификации эффективных биомаркеров фертильности быков-производителей.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-16-00131).

ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ SOD3 И GPX3 НА УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

Расова Е.Е.[1*], Тавлеева М.М.[1], Белых Е.С.[1], Рыбак А.В.[1], Черных А.А.[1], Сенча Л.М.[2], Балалаева И.В.[2], Велегжанинов И.О.[1]

1. *Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар, Россия.*
2. *Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия.*

E-mail: elrasova@mail.ru*

Окислительный стресс является ключевым фактором клеточного повреждения. Транскрипционная регуляция клеточной стрессоустойчивости посредством активации работы функционально обоснованных комбинаций антиоксидантных генов может служить перспективным подходом в борьбе с последствиями окислительного стресса. С помощью технологии CRISPRa (dCas9-VPH) в клетках HEK293T нами была достигнута выраженная транзиентная сверхэкспрессия генов *SOD3* (до 950 раз) и *GPX3* (до 50 раз), сопровождавшаяся увеличением выработки внутриклеточных фракций соответствующих белков (SOD3 — примерно в 6 раз, GPX3 — в 1,5–2 раза). Проточная цитометрия с DCFDA показала снижение базального уровня внутриклеточных АФК при одновременной сверхэкспрессии обоих генов. По данным FMCA (флуориметрического анализа цитотоксичности в микрокультурах) совместная сверхэкспрессия *SOD3* и *GPX3* достоверно повышала выживаемость клеток HEK293T при воздействии γ-излучения (2–5 Гр) и параквата (10–40 мкМ). Эффект увеличения жизнеспособности клеток был подтверждён на линии HeLa_VPH. Анализ клеточной гибели (проточная цитометрия с окрашиванием йодистым пропидием) после облучения (5 Гр) выявил значимое снижение доли мёртвых клеток при одновременной сверхэкспрессии генов относительно контроля.

Вместе с тем, сверхэкспрессия *SOD3* и *GPX3* не оказывала стимулирующего эффекта на пролиферацию клеток: анализ формирования колоний и FMCA показали её достоверное снижение, а распределение клеток по фазам клеточного цикла не отличалось от контроля. Анализ скорости миграции клеток также показал отсутствие стимулирующего эффекта сверхэкспрессии *SOD3* и *GPX3* в HEK293T, а в HeLa_VPH скорость миграции достоверно снижалась на фоне сверхэкспрессии. Таким образом, одновременная сверхэкспрессия *SOD3* и *GPX3* обеспечивает синергический антиоксидантный эффект и повышает клеточную стрессоустойчивость к ионизирующему излучению и параквату без стимуляции пролиферации и миграции, что свидетельствует об отсутствии проонкогенного потенциала данной генетической стратегии и о перспективности выбора *SOD3* и *GPX3* в качестве мишеней для одновременной транскрипционной сверхактивации.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-24-00953).

СВЯЗЬ СТВОЛОВЫХ СВОЙСТВ И НАКОПЛЕНИЯ ЛИПОФУСЦИНА С НЕОБРАТИМОСТЬЮ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ

Родимцев А.П.[1*], Толкунова Е.Н.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: a.p.rod@mail.ru*

Клеточное старение (сенесцентность) — состояние устойчивого ареста пролиферации при высокой метаболической активности. Для большинства клеток оно необратимо, но некоторые опухолевые клетки, введенные в сенесцентность терапией, способны спустя время вернуться к пролиферации. Такая способность связана с тем, что в опухолях обычно нарушена работа главных механизмов,

обеспечивающих необратимость клеточного старения — например, сигнальных путей p53/p21 и p16/pRB. Но оставшиеся механизмы поддержания необратимости клеточного старения всё-таки удерживают большинство опухолевых клеток в сенесцентном состоянии. Изучение этих механизмов и возможностей их модуляции позволит влиять на необратимость клеточного старения, увеличивая надежность противоопухолевой терапии.

Мы изучили динамику развития признаков клеточного старения и последующего возвращения к пролиферации на клетках аденокарциномы A549, вводимых в сенесцентность облучением в дозе 10 Гр. Мы выяснили, что основные события их возвращения к пролиферации происходят на третью неделю после облучения — на 14 день присутствие делящихся клеток малозаметно, а на 21 день они уже формируют субпопуляцию. Эта субпопуляция может происходить как от дормантных клеток, изначально не развивших сенесцентный фенотип в полной мере, так и от клеток, действительно бывших сенесцентными, но преодолевших связанный с этим арест пролиферации. Возвращающиеся к пролиферации клетки не несут мутаций, принципиально нарушающих формирование сенесцентности — при повторном облучении они демонстрируют те же признаки клеточного старения, что и клетки исходной популяции.

Мы сравнили формирование и устойчивость сенесцентного фенотипа у клеток, культивируемых в присутствии веществ, модулирующих лизосомальную кислотность. Снижение лизосомальной кислотности при сенесцентности нарушает работу лизосомальных ферментов и усиливает накопление липофусцина. Модуляторы давались клеткам на 7-14 дни после облучения, когда клетки уже стали сенесцентными, но еще не начали возвращаться к пролиферации. Было показано, что при различных дозировках модуляторов уровень накопленного липофусцина и доля делящихся клеток обратно коррелируют. Модулятор аутофагии торкиниб, известный своим влиянием на лизосомальную кислотность, снижает накопление липофусцина и увеличивает долю делящихся клеток.

Следовательно, устойчивость ареста пролиферации, может быть, причинно связана с уровнем липофусцина. Исследования будут продолжаться.

МОДЕЛЬ, ОБЪЯСНЯЮЩАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ РАБОТЫ КОМПЛЕКСА ДОЗОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ НА X-ХРОМОСОМЕ САМЦОВ *D. MELANOGASTER*

Рыжкова В.Е.[1*], Бабоша В.А.[1], Карягина Т.С.[1], Тихонова Е.А.[1], Георгиев П.Г.[1], Максименко О.Г[1]

1. ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва, Россия

E-mail: varvara.e.ryzhkova@gmail.com*

Комплекс дозовой компенсации (КДК) *D. melanogaster*, состоящий из белков MSL1, MSL2, MSL3, MOF, MLE и длинных некодирующих РНК roX1/2, специфично активирует Х-хромосому самцов, выравнивая дозу генов на половой хромосоме между полами. Все компоненты КДК важны для выживаемости самцов мух. MSL1 формирует коровую часть комплекса и связывается с MSL2, MSL3 и MOF. MSL3 содержит консервативный MRG-домен и участвует в активности ацетилтрансферазы MOF. Специфичность КДК не зависит от последовательности ДНК. Белок CLAMP, содержащий "цинковые пальцы" C2H2-типа, облегчает рекрутирование КДК к высоко-аффиным сайтам (HAS) через взаимодействие с MSL2 и MLE. В процессе могут участвовать и другие транскрипционные факторы (ТФ). Цель работы: определение механизмов специфичного связывания и распространения КДК на Х-хромосоме. Скрининг в дрожжевой двугибридной системе выявил 14 ТФ, связывающихся с MSL1 (из них 9 — с MSL3, 5 — с MOF). Белки CG11906, CG30020 и Topi взаимодействуют со всеми тремя белками КДК. С помощью анализа делеционных мутантов MSL1, MSL3 и MOF были определены участки связывания ТФ: неструктурированный участок на N-конце MSL1, петля в MRG-

домене MSL3, нехарактерная для других MRG-белков, и два неконсервативных региона в MOF. Делеция этих участков привела к критическим последствиям *in vivo*. Так, удаление петли в MSL3 снизило выживаемость самцов более чем в три раза. Такой мутантный вариант частично терял связь с MSL1 на X-хромосоме и перераспределялся в зоны активного хроматина на аутосомах. Похожий эффект мы наблюдали и для усеченного варианта MSL1[1–262], не способного взаимодействовать с MOF и MSL3. Этот вариант полностью терял специфичность к X-хромосоме и, как и мутантный MSL3, перенаправлялся в пуфы аутосом, где он колокализовался с РНК-полимеразой II.

Интересно, что удаление участков связывания с ТФ в MSL1[1-262] снижало ассоциацию с аутосомами, в отличие от мутантного MSL3, где такая делеция способствовала появлению бэндов на аутосомах. Противоречия объясняются разной ролью ТФ: в случае с MSL1 они облегчают распознавание HAS, а с MSL3 — удерживают связывание с генами X-хромосомы.

Таким образом, по всей видимости, рекрутирование КДК на X-хромосому опосредовано ТФ, а распространение по активным генам идет через MSL1/MSL3/MOF и РНК-полимеразу II. Низкая консервативность ТФ-связывающих участков подтверждает, что компоненты системы не возникали *de novo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-14-00331).

ОЦЕНКА МЕТАЛЛ-ИНДУЦИРОВАННОГО МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ОТВЕТА У НЕМАТОДЫ *CAENORHABDITIS ELEGANS* С ВРОЖДЕННЫМ ДЕФЕКТОМ СИСТЕМЫ ГОМЕОСТАЗА МЕДИ

Самусева П.Д.[1*]

1. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: samusevap@yandex.ru*

Сочетание дисфункции митохондрий (Мт) и нарушение процесса их элиминации (митофагия) ведет к развитию канцерогенеза, нейродегенеративных, метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний. Дисбаланс меди (Cu), эссенциального микроэлемента, развивающийся вследствие врожденных дефектов её метаболизма, индуцирует накопление Cu в Мт, вызывающее купроптоз. При этом митофагия выступает как ключевой механизм контроля качества Мт как у млекопитающих, так и нематод. Целью данной работы является оценка активности генов аутофагии и митофагии у нематод *C. elegans* с мутацией H828Q в гене *cua-1* (штамм *cua-1*^{H828Q}, модель болезни Вильсона), в присутствии избытка Cu или Ag, ее электронного аналога. Работа выполнена на личиночных формах и молодых взрослых нематодах. Рассмотрены гены, участвующие в митофагии и аутофагии: *pink-1, pdr-1, dct-1, unc-51, atg-3* и *lgg-1*. Уровень их активности оценивали методом qPCR, субклеточные фракции выделяли методами дифференциального и равновесного центрифугирования, присутствие мтДНК выявляли методом ПЦР, концентрацию металлов измеряли методом ААС. Полученные результаты показали, что экспрессия генов митофагии зависит от стадии развития нематоды и у *cua-1*^{H828Q} не отличается от дикого типа (N2). В присутствии Cu у *cua-1*^{H828Q}, в отличие от N2, активность генов-маркеров повреждения Мт и начала формирования аутофагосом (*pink-1, dct-1, unc-51* и *atg-3)* повышается, начиная со стадии L2. Обработка нематод Ag(I) (источник наночастицы серебра) продемонстрировала, что у *cua-1*^{H828Q} на стадии L2 в

десятки раз повышается активность генов аутофагии (*dct-1* и *atg-3*). К тому же в Мт нематод *cua-1*^{H828Q} селективно накапливается Ag, и происходит изменение распределения Мт в клетке. Данные согласуются с представлениями, что металл-индуцированное повреждение Мт сопровождается активацией аутомитофагии. Полученные результаты подтверждают перспективность *C. elegans cua-1*^{H828Q} как модели для изучения дисфункции Мт. Модель может быть использована для изучения механизмов развития социально значимых заболеваний, связанных с нарушением Мт, и первичного скрининга соединений, способных корректировать нарушения контроля качества Мт.

Работа выполнена в рамках темы гос. задания FGWG-2025-0021.

ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ PDGFRa+ КЛЕТОК ИЗ ЛЕГКИХ МЫШЕЙ C57BL/6

Степанова А.В.[1*], Говорова И.А.[1], Воротеляк Е.А.[1,2]

1. *Институт биологии развития имени Н. К. Кольцова РАН, Москва, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия*

E-mail: arina_stepanova936@mail.ru*

Клетки мезенхимного происхождения в легких представляют собой гетерогенную популяцию, для которой не существует общепринятой классификации. Среди них значительную долю составляют PDGFRα^{+} клетки, примечательные своей ролью во взаимодействии с эпителием. Они участвуют в развитии легких, патогенезе фиброза, формируют нишу альвеолоцитов II типа (Li et al., 2018). Однако их получение и длительное культивирование затруднены из-за их низкой представленности в ткани и высокой фенотипической пластичности, поэтому имеющиеся данные об их свойствах *in vitro* остаются противоречивыми. Целью работы являлось получение

PDGFRα$^+$ клеток из легких мышей линии C57BL/6, их фенотипическая характеристика и оценка особенностей культивирования.

Легкие двухмесячных самцов мышей линии C57BL/6 заполняли диспазой, измельчали и инкубировали с коллагеназой IV типа при 37°C. PDGFRα$^+$ клетки выделяли методами MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) и FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting). Клетки культивировали на жестком субстрате в среде DMEM/F12 с добавлением 10% FBS. Для характеристики выделенных популяций использовали проточную цитометрию, иммуноцитохимический анализ (антитела против αSMA, PDGFRα) и RT-ПЦР (*Acta2, Myh11, Col1a2, Tagln*).

После удаления эпителиальных (EpCAM$^+$) клеток были получены три фракции: тотальная мезенхима (EpCAM$^-$), PDGFRα-отрицательная (EpCAM$^-$PDGFRα$^-$) и PDGFRα-положительная фракции (EpCAM$^-$PDGFRα$^+$). По данным проточной цитометрии, доля PDGFRα$^+$ клеток увеличивалась с 14% в исходной мезенхимной популяции до 40% после MACS. Клетки фракции EpCAM$^-$PDGFRα$^+$ обладали повышенной экспрессией *Acta2, Myh11, Col1a2* и *Tagln* по сравнению с остальными фракциями. При культивировании на пластике наблюдалось увеличение доли αSMA+ клеток до 77% через 48 часов, а также формирование актиновых стресс-фибрилл, характерных для миофибробластов. При этом около 50% клеток сохраняли экспрессию PDGFRα.

При использовании FACS из 2×10^6 клеток фракции EpCAM$^-$CD45$^-$ удавалось получить около 1×10^5 PDGFRα$^+$ клеток. Однако поддерживать полученную популяцию в культуре удавалось не более одного пассажа.

Таким образом, выделенные PDGFRα$^+$ клетки быстро приобретали признаки миофибробластов при культивировании на пластике, что свидетельствует о высокой фенотипической пластичности данной популяции *in vitro*. Полученные результаты подчеркивают необходимость разработки условий культивирования, обеспечивающих сохранение исходного фенотипа PDGFRα$^+$ клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-74-30015-П).

ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ НА МАТРИЧНОЙ РНК С 5′-НТО ВИРУСНОЙ РНК SARS-CoV-2

Сулима М.О.[1*], Сахаров П.А[1]

1. ФГБУН «Институт белка РАН», Пущино, Россия

E-mail: m4rine.sulima@yandex.ru*

SARS-CoV-2 – одноцепочечный (+)РНК-вирус семейства *Coronaviridae*, ответственный за пандемию COVID-19. Высокая контагиозность, способность к мутагенезу и формированию иммунно-уклоняющихся вариантов делают его актуальной угрозой, требующей разработки новых терапевтических подходов (Zhu et al., 2020). Геномная РНК вируса содержит 5′-кэп и 3′-поли-А-хвост. 5′-нетранслируемая область (5′-НТО) РНК вируса формирует шпилечные структуры, важные для инициации трансляции и репликации. Особенностью 5′-НТО SARS-CoV-2 является наличие нескольких потенциальных старт-кодонов в одной рамке считывания: неканонического CUG[59] и двух канонических AUG[107] и AUG[266]. Также в составе 5′-НТО располагаются стоп-кодоны (Stop[117], Stop[120], Stop[251]), принадлежащие предшествующей открытой рамке считывания (upstream open reading frame, uORF) (Miao et al., 2021).

Основной вопрос настоящей работы – с какого именно стартового кодона в 5′-НТО геномной РНК SARS-CoV-2 происходит инициация трансляции первого белка коронавируса (NSP1 – первый неструктурный белок).

Для ответа на этот вопрос методами сайт-направленного мутагенеза были получены кДНК с точечными заменами в названных кодонах. Используя полученные конструкции, синтезировали мРНК, которые далее транслировали в бесклеточной системе на основе экстракта

зародышей пшеницы (WGE). Эффективность трансляции оценивали путем непрерывной детекции накопления sfGFP по его флуоресценции (Pédelacq et al., 2006). Для определения электрофоретической подвижности синтезируемых полипептидов, а следовательно, и выяснения, с какого из старт-кодонов происходит биосинтез белка, использовали мечение радиоактивной аминокислотой, [^{14}C]-лейцином. Синтезированные полипептиды разделяли в денатурирующем ПААГ с линейным градиентом акриламида.

Показано, что инициация трансляции на мРНК, содержащей 5′-НТО геномной РНК SARS-CoV-2, может происходить со всех стартовых кодонов: CUG^{59}, AUG^{107} и AUG^{266}. Но основным стартовым кодоном для начала трансляции геномной РНК вируса SARS-CoV-2 служит AUG^{266}.

Полученные данные свидетельствуют о том, что uORF в составе 5′-НТО функционирует как негативный регулятор, подавляя трансляцию основной рамки считывания.

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ М1 ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ

Суркова Д.Е.[1*], Шакирова К.М.[1], Вишнякова П.В.[1]

1. *НИИ Молекулярной и Клеточной Медицины Медицинского института РУДН имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия*

E-mail: surkova-de@rudn.ru*

Макрофаги – высокопластичные эффекторные клетки врожденного иммунитета, изменяющие фенотип в ответ на сигналы микроокружения. Поляризация макрофагов в провоспалительный (М1) или противовоспалительный (М2) фенотип играет важную роль в регуляции противоопухолевого иммунного ответа и во многом определяет эффективность противоопухолевой терапии. Поэтому разработка репортерных клеточных систем, для оперативного оценивания фенотипического состояния макрофагов

под действием лекарственных препаратов, является актуальной задачей.

Цель исследования – создание репортерной клеточной тест-системы для определения M1/M2 поляризации макрофагов. На первом этапе работы были апробированы тест-системы на основе промоторов генов NF-kB и CCL8. Методом количественной ПЦР в реальном времени было обнаружено повышение экспрессии генов в провоспалительных макрофагах. Промоторные последовательности генов были клонированы в лентивирусные трансферные плазмиды так, чтобы экспрессия репортерного флуоресцентного белка находилась под их контролем. Лентивирусные частицы получали, используя 5-плазмидную систему. Клетки линии THP-1 трансдуцировали с последующей селекцией бластицидином S. Дифференцировку клеток в макрофаги индуцировали PMA, после чего поляризовали LPS (M1) или IL-4 (M2). Дополнительно оценивали влияние химиотерапевтического препарата Паклитаксел-Эбеве на активацию репортерных конструкций.

Оценку фенотипа модифицированных макрофагов выполняли через 24 часа после поляризации методом флуоресцентной микроскопии с количественным анализом интегральной плотности (Integrated Density). Для обеих репортерных конструкций зарегистрировано статистически значимое увеличение интенсивности флуоресценции в M1-макрофагах по сравнению с клетками M0- и M2-фенотипов. При воздействии Паклитаксел-Эбеве репортерная система на основе промотора NF-kB выявила M1-поляризацию, тогда как для конструкции с промотором CCL8 статистически значимых различий между исследуемыми группами не обнаружено.

Таким образом, разработаны две лентивирусные репортерные клеточные тест-системы для оценки M1-поляризации макрофагов. Полученные результаты подтверждают эффективность созданных конструкций и демонстрируют перспективность их применения для создания двурепортерной тест-системы для исследования фенотипа макрофагов, а также для разработки подходов к

персонализированной оценке эффективности противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-15-00088).

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ NOTCH СПОСОБСТВУЕТ ПРОФИБРОТИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ЛЕГОЧНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ И ФОРМИРОВАНИЮ ПРОФИБРОТИЧЕСКОГО ПАРАКРИННОГО ЭФФЕКТА

Тарасов М.С.[1*], Кузнецова Е.А.[1], Малашичева А.Б.[1]

1. ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: m.tarasov21@yandex.ru*

Идиопатический легочный фиброз является хроническим заболеванием, характеризующимся избыточным накоплением внеклеточного матрикса вследствие активации и миофибробластной трансформации легочных фибробластов. Ключевым регулятором этого процесса считается сигнальный путь TGFβ, однако роль сигнального пути Notch в контексте идиопатического легочного фиброза остается недостаточно изученной.

Целью данного исследования являлось изучение влияния сигнального пути Notch на профибротическую активацию легочных фибробластов и их паракринную активность.

Первичные человеческие легочные фибробласты трансдуцировали лентивирусными конструкциями, обеспечивающими экспрессию внутриклеточного домена рецептора Notch1 (NICD1), либо контрольными векторами. Для активации сигнального пути TGFβ клетки стимулировали TGFβ1. Экспрессию генов *HES1*, *ACTA2*, *COL1A1*, *TGFB1* и *NOTCH1* определяли методом количественной ПЦР. Для оценки паракринного эффекта интактные фибробласты

инкубировали с кондиционированной средой, полученной от клеток с совместной активацией Notch и TGFβ.

Активация Notch в человеческих легочных фибробластах сопровождалась повышением экспрессии *HES1*, *ACTA2*, *COL1A1*, *TGFB1* и *NOTCH1*, что свидетельствует об активации профибротической транскрипционной программы. Кондиционированная среда, полученная от клеток с совместной активацией Notch и TGFβ, индуцировала повышение экспрессии *ACTA2* в интактных фибробластах, указывая на секрецию растворимых факторов, способных вызывать профибротическую активацию.

Активация сигнального пути Notch участвует в профибротической активации человеческих легочных фибробластов и, в сочетании с TGFβ, способствует формированию паракринного эффекта, способного индуцировать активацию интактных фибробластов. Полученные результаты свидетельствуют о возможном участии сигнального пути Notch в профибротической активации фибробластов и в распространении профибротических сигналов посредством растворимых факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №25-15-00126).

СОЗДАНИЕ И СКРИНИНГ РНКИ-БИБЛИОТЕК КАК МЕТОД ПОИСКА НОВЫХ ЭФФЕКТИВНЫХ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ ДЛЯ КОНТРОЛЯ НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Тимофеев С.А.[1*], Фадеев Р.Р.[1], Давыдова К.Р.[1], Долгих В.В.[1]

1. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

E-mail: ts-bio@ya.ru*

РНК-интерференция (РНКи) - процесс подавления экспрессии генов, за счет воздействия на мРНК, обнаруженный у многих эукариот. В данной работе мы рассматриваем наиболее распространенный механизм индукции РНКи, основанный на проникновении в клетки молекул двухцепочечной РНК (дцРНК), комплементарной участку определенного гена.

В настоящее время РНКи широко применяется, в том числе в области защиты растений. Использование дцРНК позволяет специфично подавлять экспрессию жизненно важных генов сельскохозяйственных вредителей, практически не оказывая воздействия на нецелевые организмы. Однако ключевым этапом разработки таких препаратов остается выбор эффективного гена-мишени. РНКи-опосредованное подавление экспрессии многих жизненно важных генов не приводит к выраженным нарушениям жизнедеятельности организма, а эффективность воздействия на ортологичные гены может существенно различаться даже у близкородственных видов. В результате число описанных универсальных генов-мишеней, эффективных хотя бы у нескольких видов насекомых-вредителей, остается ограниченным.

В данной работе на примере колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*) мы разработали новую методику поиска перспективных генов-мишеней для РНКи. На основе мРНК, выделенной из личинок насекомого, мы создали РНКи-библиотеку, представляющую собой совокупность молекул кДНК, соответствующих пулу транскриптов длиной 200–1200 п.н.,

клонированных в плазмидном векторе для синтеза соответствующих дцРНК в бактериях или *in vitro*. Далее мы провели биотестирование на личинках *L. decemlineata* первых 200 вариантов дцРНК, случайно встроенных в библиотеку и экспрессированных в бактериях *E. coli* HT115 (DE3). В результате нам удалось выявить 11 новых потенциальных генов-мишеней, среди которых наибольший интерес представляет ген, кодирующий ранее не охарактеризованный белок, не имеющий известных ортологов у других насекомых. Такой ген не мог быть выявлен традиционными методами поиска, что подчеркивает перспективность предложенного подхода.

В докладе мы представим основные этапы создания РНКи-библиотеки, синтеза и выделения дцРНК, проведения биотестирования. Для увеличения представительности библиотеки оказалось необходимым ее клонирование с дополнительной рестрикционной обработкой до переноса в штамм для синтеза дцРНК. Трудоемкость биотестирования удалось снизить за счет первоначального использования смесей из 10 случайных вариантов для кормления насекомых.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-16-00321).

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА ЛИПИДНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК

Туманов А.Г.[1*], Антипенко И.Д.[1]

1. *Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия*

E-mail: tumanovv0503@gmail.com*

Липидный метаболизм – одна из наиболее пластичных составляющих клеточного метаболизма, которая подвергается глубокой перестройке при гипоксии – характерной особенности опухолевого микроокружения, ишемии и хронического воспаления

(Semenza, 2012). Роль HIF в регуляции углеводного метаболизма изучена лучше, тогда как его интеграция с липидным обменом систематизирована недостаточно, а результаты отдельных исследований противоречивы (Mylonis et al., 2019). Целостное представление о координации HIF-зависимых и HIF-независимых механизмов перестройки липидного обмена отсутствует.

Цель работы – систематизация данных о HIF-зависимых и HIF-независимых механизмах регуляции липидного метаболизма при гипоксии и разработка интегральной модели гипоксической перестройки липидного обмена.

Разработана интегральная модель гипоксической перестройки липидного обмена, объединяющая сведения о прямых и непрямых генах-мишенях HIF, а также о HIF-независимых механизмах регуляции, и отражающая факторы, лежащие в основе контекст-зависимых противоречий в литературе.

Показано, что гипоксия перепрограммирует липидный обмен, смещая баланс от катаболизма к анаболизму. Анализ литературы позволил сформировать интегральную модель, отражающую взаимосвязь HIF-зависимых и HIF-независимых механизмов регуляции. HIF-1 активирует PPARγ, FABP3/4/7, LRP1, VLDLR и SREBP-1-зависимую экспрессию FASN, усиливая поглощение и синтез жирных кислот *de novo*; при ограничении окислительного метаболизма синтез жирных кислот поддерживается за счёт восстановительного карбоксилирования глутамина. Жирные кислоты депонируются в липидных каплях при участии AGPAT2, липина-1, PLIN2 и HIG2, предотвращая липотоксичность. HIF-1 и HIF-2 подавляют β-окисление за счёт снижения PGC-1α, CPT1A и MCAD/LCAD. Снижение активности SCD1 и FADS вызывает накопление насыщенных жирных кислот, компенсаторный захват ненасыщенных ЖК и LPCAT-зависимое ремоделирование мембран. Контекст-зависимость объясняет сохранение β-окисления в опухолевых моделях.

Перестройка липидного обмена при гипоксии – единая адаптивная программа, интегрированная с HIF-сигналингом на уровне

транскрипционной регуляции и HIF-независимых путей. Модель может служить теоретической основой для поиска терапевтических мишеней при онкологических, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях.

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ-РЕПОРТЕРОВ ДЛЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ СЕНЕСЦЕНТНЫХ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ

Ушакова А.А.[1,2*], Кузьмик И.В[1,3]. Демидов О.Н.[1,4], Пухальская Т.В.[1,4]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия;*
2. *ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия;*
3. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия;*
4. *АНОО ВО Научно технологический университет «Сириус», Сириус, Россия.*

E-mail: alina.ush2002@gmail.com*

Опухоль-ассоциированные макрофаги (от англ. Tumor-associated macrophages, TAMs) — наиболее распространенная популяция иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль. TAMs пластичны и поляризуются в два основных фенотипа: провоспалительные M1 и противовоспалительные M2. M2-подобные макрофаги в ряде моделей связаны с локальной пролиферацией и тканевым ремоделированием, тогда как M1-подобные чаще ассоциированы с эффекторной функцией и выходом из цикла деления. Высокое соотношение M2/M1 коррелирует с плохим прогнозом и агрессивным течением заболевания. Противоопухолевая терапия может вызывать состояние сенесцентности (от англ. senescence) — необратимой остановки клеточного цикла, сопровождающегося секрецией провоспалительных факторов. Сенесцентные макрофаги,

несмотря на потерю способности к делению, активно способствуют прогрессии опухоли через хроническое воспаление, снижение презентации антигенов и нарушение фагоцитоза.

Репортер p27-mVenus позволяет идентифицировать клетки в состоянии G0/quiescence и наблюдать переход G0–G1. Репортер Fucci(CA)5 позволяет дифференцировать G2/M, S и G1 фазы клеточного цикла. Комбинация репортеров может стать инструментом для разделения покоящихся и пролиферирующих клеток, а также определить их сенесцентный статус в моделях воспаления и канцерогенеза при совместной оценке классических маркеров стареющих клеток (p16, p21, SA-β-Gal) и маркеров M1/M2 макрофагов.

Цель работы: создание клеточных линий-репортеров для визуализации клеточного цикла и стабильности p27kip1 в миелоидных клетках на основе систем Fucci(CA)5 и p27kip1-mVenus. Методы: для создания репортерных клеточных линий использовали плазмиды pCDH-EF1-mVenus-p27K− и pLentiFUCCI(CA)5. Лентивирусные частицы получали путем котрансфекции плазмид pMD2.G, psPAX2 и целевой репортерной плазмиды в клетках HEK293T. Трансдукцию клеток острого миелоидного лейкоза THP-1 проводили в полной питательной среде с добавлением протамина сульфата (50 мкг/мл) и лентивируса. Эффективность трансдукции и экспрессию репортеров оценивали методом проточной цитометрии.

Результаты: получены стабильные репортерные клеточные линии THP-1, позволяющие в реальном времени отслеживать клеточный цикл и стабильность белка $p27^{kip1}$.

Полученные репортерные линии позволят в режиме реального времени исследовать эффекты TAMs в ответ на воспаление, химиотерапию, терапию сенолитиками и охарактеризовать функции $p27^{kip1}$ в сенесцентных миелоидных клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-25-00882).

ВИРУС-ОПОСРЕДОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА В КЛЕТКАХ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСАМИ ГЕПАТИТА B И D

Федулов А. П.[1*], Иванов А. В.[1]

1. *Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, Россия, Москва*

E-mail: fedulovtt@gmail.com*

Вирусы гепатита B (ВГВ), C (ВГС) и D (ВГD) являются патогенными гепатотропными вирусами человека, вызывающими хронические заболевания печени. Они ответственны за 80% всех случаев цирроза печени и рака и ежегодно вызывают гибель около 750 тыс. пациентов в мире. Патогенез ВГВ и ВГD связывают с продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов, включая TNFα, IL-1β, CXCL8 и CXCL10. Современные противовирусные препараты против гепатита снижают уровни инфекций, но не излечивают пациентов.

Исследования ВГВ и ВГD основаны на несовершенных моделях - линиях клеток гепатомы или прогениторных клеток печени, сверхэкспрессирующих рецептор проникновения вирионов — NTCP. Однако гиперэкспрессии NTCP недостаточно для обеспечения пермиссивности клеток, и все исследования проводятся на смешанной популяции инфицированных и неинфицированных клеток.

Клеточный метаболизм тесно связан с пролиферацией и дифференцировкой клеток, и его нарушение приводит к развитию широкого спектра патологий. То, как ВГВ и ВГD вмешиваются в метаболические системы клеток практически не известно. Предыдущие эксперименты нашей группы в смешанных культурах продемонстрировали, что ВГD вызывает IFNβ-опосредованное изменение метаболизма аминокислот и цикла Кребса (Khomich et al., CDD 2025). Целью настоящего исследования является исследование событий именно в инфицированных клетках при помощи РНК-секвенирования единичных клеток (scRNA-seq).

В данной работе проведено секвенирование РНК единичных клеток в инфицированных культурах прогениторных клеток печени HepaRG на платформе 10X Genomics. В сотрудничестве с Лионским центром гепатологии был разработан биоинформатический алгоритм, выделяющий в данных scRNA-seq кластеры на основе вирусных транскриптов. Выявлены кластеры с моноинфекцией ВГВ и ВГD на основе экспрессии вирусных транскриптов, установлен ряд дифференциально экспрессируемым генов в данных кластерах. Моноинфицированные ВГD клетки характеризуются изменением экспрессии ферментов метаболизма жирных кислот и холестерина, включая сывороточные амилоиды SAA1 и SAA2, ACACB, CYP4F3 и CYP4B1, а также ряда цитокинов и хемокинов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №24-25-00332).

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКА STING: ЭВОЛЮЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

Фефилова Е.А.[1*], Невзоров И.А[1], Дакс А.А.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

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

STING (Stimulator of Interferon Genes) — ключевой белок врождённого иммунитета, активирующийся при попадании нуклеиновых кислот в цитоплазму и через связку cGAS–IRF3 запускающий интерфероновый ответ и воспаление; при этом есть данные, что STING-зависимый сигналинг принимает участие и в других клеточных процессах, таких как апоптоз и аутофагия, что указывает на потенциальное наличие множества ещё не изученных белков-партнёров. Идентификация этих взаимодействий важна для уточнения роли STING в иммунном ответе, поиска новых терапевтических мишеней при инфекционных, онкологических и

аутоиммунных заболеваниях, а также для разработки иммуностимулирующих и иммуносупрессивных агентов. Кроме того, необходимо провести филогенетическую реконструкцию доменной архитектуры STING у *Metazoa*, что позволит выявить консервативные функциональные регионы и проследить их эволюцию, а также подобрать модели *Metazoa* для доклинического тестирования препаратов.

Филогенетический анализ 224 последовательностей STING выявил обособление позвоночных в отдельную ветвь, что связано с появлением у них С-концевого хвостового домена STING (CTT). Также установлено, что белок STING отсутствует у плоских и круглых червей, что может быть объяснено компенсацией его функций альтернативными иммунными механизмами. Анализ доменной архитектуры показал высокую консервативность трансмембранного и лиганд-связывающего доменов у всех исследованных представителей *Metazoa*, тогда как С-терминальный домен впервые появляется в эволюции только у круглоротых и вторично утрачивается у амфибий, что указывает на приобретение STING-опосредованного IRF3-сигналинга у позвоночных и его отсутствие у беспозвоночных и амфибий.

С использованием алгоритма MirrorTree нами были идентифицированы потенциальные белки-партнёры STING. Последующий структурный анализ методом молекулярного докинга подтвердил физическую возможность взаимодействия STING с тремя белками — ZDHHC4 и RSAD2 у позвоночных, а также IMD у беспозвоночных.

Полученные данные не только уточняют картину эволюции белка STING у Metazoa, но и открывают перспективы для дальнейшего экспериментального изучения найденных взаимодействий — в частности, методами иммунопреципитации и GST-pulldown — а также рассмотрения ZDHHC4 и RSAD2 в качестве потенциальных мишеней для модуляции STING-зависимого иммунного ответа при разработке противоопухолевой и противовоспалительной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 26-15-00428).

ВЛИЯНИЕ 72-ЧАСОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ *IN VITRO* БИСФЕНОЛА А НА УРОВЕНЬ ГИСТОНА H3K9me3 В ЭМБРИОНАХ *MUS MUSCULUS* НА СТАДИИ МОРУЛЫ

Челышева Л.А.[1*], Ониашвили Е.М. [1], Сучкова И.О. [1], Баранова Т.В. [1], Паткин Е.Л. [1]

1. *ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail[*]: llubapro@yandex.ru

Бисфенол А (БФА), широко используемый в производстве пластиковых изделий, является токсичным соединением способным нарушать важнейшие эпигенетические процессы в раннем эмбриогенезе. В доимплантационнный период эмбрионального развития вариант гистона H3K9me3 претерпевает существенное ремоделирование, создавая гетерохроматиновую среду, способствующую формированию соответствующего клеточного репрограммирования и пластичности. До имплантации на стадии морулы бластомеры эмбриона детерминируются по двум направлениям дифференцировки – во внутреннюю клеточную массу либо в трофэктодерму.

Цель – установить характер влияния БФА на модификацию гистона H3K9me3 в ядрах эмбрионов мышей на стадии морулы.

Исследование проводили на мышах гибридах F1 (C57BLX CBA) (8-10-недельного возраста). Были сформированы три экспериментальные группы: 1) Контроль-интактный ($К_{инт}$) – культивирование в среде M16; 2) Контроль-EtOH ($К_{EtOH}$) – культивирование в среде M16 с 0,1% этанолом в качестве растворителя БФА; 3) БФА – культивирование в среде M16 в присутствии 50 мкМ БФА. Сравнение уровня триметилирования гистона H3K9 у доимплантационных эмбрионов на стадии морулы

проводили через 72 ч культивирования, путем измерения интенсивности флуоресценции антител к H3K9me3 интерфазных ядер бластомеров.

Установлено, что на стадии морулы БФА приводит к полногеномному повышению уровня H3K9me3 по сравнению с $К_{инт}$ (в 1,2 раза, - $p < 0,001$) и $К_{EtOH}$ (в 1,1 раза, $p = 0,017$).

Полученные данные указывают на то, что БФА затрагивает молекулярные пути, регулирующие процесс метилирования гистона H3K9, т.е. может влиять на какие-то гистоновые метилтрансферазы и/или деметилазы.

72 ч воздействие БФА в доимплантационный период может нарушать нормальный паттерн эпигенетического репрограммирования и вызывать изменения в разных генных сетях, что, в свою очередь, может приводить к аномальной цитодифференцировке эмбриональных клеточных линий, и, тем самым, повышать риск развития различных патологий на постимплантационных и/или постнатальных стадиях онтогенеза.

Работа выполнена в рамках Государственного задания FGWG-2025-0019.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ КАРИОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК ЛИНИИ K562, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЯДЕРНЫЙ ВАРИАНТ БИОСЕНСОРА HyPer

Чербакова П.М.[1,2*], Гринчук Т.М.[1], Шорохова М.А.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: polinacherbakova@gmail.com*

Активные формы кислорода в клетках (в первую очередь перекись водорода H2O2) имеют двоякую функцию: в норме выступают в роли сигнальных молекул, но при избытке вызывают повреждение и гибель клеток. Для измерения количества H2O2 и оценки работы антиокислительных систем необходимы специальные инструменты-биосенсоры, например, биосенсер HyPer. Мониторинг флуресценции HyPer в различных компартментах живых клеток человека используется для отслеживания внутриклеточного уровня H2O2 в зависимости от времени. Клетки хронической миелоидной лейкемии человека K562 обладают высокой активностью системы Trx/TrxR (один из главных универсальных антиоксидантных и регуляторных механизмов клетки), поэтому в данной работе использовались именно они.

В работе анализировалась репортерная линия K562-HyPer-Nuc, экспрессирующая ядерный вариант биосенсора HyPer. Так как любые вмешательства в геном могут повлечь за собой изменения в кариотипе, то важно проводить кариотипический анализ после генетических модификаций клеток.

Цель настоящей работы заключалась в сравнительном анализе кариотипической стабильности репортной линии K562-HyPer-Nuc в сравнении с контрольными клетками без биосенсора.

В работе был использован метод кариотипического анализа G-бандированных метафазных хромосом (G-бэндинг).

В результате кариотипического анализа было показано, что клеточная линия K562 характеризуется гипердиплоидным кариотипом. Модальное число хромосом - 54, пределы изменчивости - 38-70 хромосом, количество маркерных хромосом – 22. Уровень полиплоидизации популяции 2%. Кроме того, было обнаружено присутствие микрохромосом в популяции.

Клеточная линия K562-HyPer-Nuc также характеризовалась гипердиплоидным кариотипом. Модальное число хромосом - 58, пределы изменчивости - 44-69 хромосом, количество маркерных хромосом – 12. Уровень полиплоидизации популяции 2,3%. Аналогично было обнаружено присутствие микрохромосом в популяции.

Таким образом, в результате сравнительного кариотипического анализа было выявлено сужение пределов изменчивости числа хромосом, небольшой сдвиг модального числа до 58 и снижение числа маркерных хромосом в клетках с биосенсором. Следовательно, можно заключить, что в клеточной линии K562-HyPer-Nuc кариотип стал более стабильным и вероятно, более однородным по популяции, что может отражать отбор клеток с менее выраженной хромосомной нестабильностью или клональную селекцию после генетической модификации.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРК № 075-15-2025-482.

РОЛЬ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗ КЛАССА I В РАННИХ ЭТАПАХ РЕПЛИКАЦИИ ВИЧ-1

Шехтман С. П.[1*], Агапкина Ю. Ю.[1,2], Готтих М. Б. [1,2]

1. *ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия*
2. *НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия*

E-mail: sofia.shekhtman@chemistry.msu.ru*

Одним из перспективных подходов к ингибированию репликации вируса иммунодефицита человека I-го типа (ВИЧ-1) является воздействие на комплексы вирусных ферментов с клеточными белками-партнерами. Поэтому актуальной задачей является изучение роли таких партнеров в жизненном цикле вируса. Известно, что вирусный фермент интеграза ацетилируется по четырем остаткам С-концевого домена её клеточными партнерами – гистонацетилтрансферазами (Ceresto et al., 2005). А также выдвинута гипотеза, что интеграза может быть деацетилирована её партнером гистондеацетилазой HDAC1, представителем I-го класса гистондеацетилаз (Allouch et al., 2011). Тем не менее, достоверно неизвестно, как именно HDAC1 и другие представители данного класса гистондеацетилаз вовлечены в ранние этапы жизненного цикла ВИЧ-1 и может ли интеграза выступать субстратом для данных ферментов.

В ходе настоящей работы было показано, что ингибирование гистондеацетилаз I-го, но не II-го класса стимулирует репликацию псевдовирусных частиц. Установлено, что ингибитор HDAC I-го класса Hydrazostat усиливает не только транскрипцию провируса, но и ранние этапы репликации ВИЧ-1, причем воздействие происходит уже в первые часы после заражения. В то же время избирательный нокдаун HDAC1 и HDAC3 не приводил к подобному стимулирующему эффекту. Также было показано, что внесение мутаций в интегразу, лишающих её способности ацетилироваться, снижает эффективность репликации псевдовирусных частиц на этапе постинтеграционной репарации. Однако мутации по сайтам

ацетилирования интегразы не влияли на стимулирующее действие ингибиторов HDAC I-го класса, что свидетельствует о том, что интеграза не выступает субстратом для HDAC. Полученные данные позволяют предположить, что гистондеацетилазы I-го класса вовлечены в ранние этапы репликации ВИЧ-1 посредством деацетилирования белковых факторов, отличных от интегразы. При этом деацетилирование происходит уже в первые часы после заражения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-64-00006-П).

Стволовые клетки и регенеративная биомедицина

POU5F1-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНА TCF19 В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

Александрова Е.В.[1*], Ермакова В.В.[1], Томилин А.Н.[1], Кузьмин А.А.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: e.aleksandrova@incras.ru*

Ген *Pou5f1* экспрессирует Oct4 – транскрипционный фактор, необходимый для поддержания плюрипотентных свойств эпибласта и культивируемых эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Наличие альтернативных функций данного гена, его функциональной активности в соматических клетках – дискуссионные темы. Свидетельствами наличия такой активности выступают исследования, в которых нокаут *Pou5f1* в эндотелиальных (Shin et al., 2022) и гладкомышечных (Cherepanova et al., 2016) клетках мыши путём удаления промотора и первого экзона вёл к ухудшению патогенеза атеросклероза. Наша гипотеза состоит в том, что промотор *Pou5f1* обладает цис-регуляторной активностью, и описанный эффект нокаута связан не с удалением белка Oct4, а с нарушением этой активности вследствие делеции промотора.

В процессе исследования цис-регуляторной активности *Pou5f1* мы обнаружили, что делеция промотора и первого экзона данного гена в ЭСК мыши приводит к повышению экспрессии ближайшего соседа *Pou5f1* – гена *Tcf19*. Данный эффект сохранялся при дифференцировке клеток в трофэктодермальном, а также эндотелиальном направлениях. Более того, в полученных эндотелиальных клетках количество дифференциально экспрессированных генов резко нарастало в сравнении с культурой ЭСК. Так, основными группами генов, чья экспрессия была нарушена в эндотелиальных клетках в ответ на удаление цис-

регуляторной области внутри *Pou5f1*, стали гены, отвечающие за ангиогенез и межклеточные взаимодействия.

После обнаружения такого эффекта мы решили выяснить, проявляется ли выявленная цис-регуляторная активность в дифференцированных клетках независимо от плюрипотентной стадии или наследуется из ЭСК. Для ответа на этот вопрос мы использовали линию ЭСК, которая позволяет проводить делецию в промоторной области *Pou5f1* на любом этапе культивирования клеток за счёт добавления тамоксифена. Клетки дифференцировали в эндотелиальном направлении при помощи эмбриоидных телец. Последующий анализ при помощи количественной ПЦР продемонстрировал высокую эффективность делеции в 84%, при этом разницы в экспрессии *Tcf19* обнаружено не было.

Таким образом, наши данные показывают, что эффект делеции промотора *Pou5f1* на экспрессию *Tcf19* обнаруживается на стадии ЭСК, когда оба этих гена активны, и затем наследуется в ряду поколений дифференцированных клеток, усиливая различия между линиями.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-75-10131).

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ *B2M*, *CIITA* И *PVR* В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

Антонов Д.О.[1,2*], Сосновцева А.О.[3], Николенко В.Н.[2]

1. *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии имени академика И.И. Дедова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ», Москва, Россия*
3. *ФГБУН «Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН», Москва, Россия*

E-mail: antonov_d_o@student.sechenov.ru*

Аллогенные производные индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) — перспективный источник клеточных продуктов, однако их применение ограничено HLA-зависимым Т-клеточным распознаванием. Нокаут генов *B2M* и *CIITA* приводит к подавлению экспрессии HLA классов I и II, но утрата HLA-I может усиливать NK-клеточную цитотоксичность. PVR/CD155, лиганд активирующего рецептора DNAM-1, является дополнительной мишенью для модуляции NK-ответа (Deuse et.al, 2019; Thongsin et.al, 2023; Bottino et.al, 2003; Wang et.al, 2021). Цель работы — получить и охарактеризовать кандидатные линии иПСК после последовательного редактирования генов *B2M*, *CIITA* и *PVR*.

Линию S1 последовательно редактировали системой CRISPR/Cas9 с клональным отбором. Целевые локусы анализировали секвенированием по Сэнгеру, экспрессию генов — количественной ОТ-ПЦР, поверхностный фенотип — проточной цитометрией до и после стимуляции IFN-γ (200 нг/мл, 24–72 ч). Оценивали HLA-ABC, HLA-DR, PVR/CD155 и TRA-1-60; цитогенетическую стабильность — кариотипированием.

Нокаут гена *B2M* снизил медиану HLA-ABC с 3352 до 109 усл. ед. (96,7%). В клоне с редактированием гена *CIITA* после 72 ч

стимуляции IFN-γ доля HLA-DR$^+$ клеток составила 1,3% против 61,4% в исходной линии. В клоне P42 после редактирования гена *PVR* медиана CD155 снизилась с 539 до 353 усл. ед. (34,5%). Секвенирование выявило биаллельные инделы со сдвигом рамки считывания в генах *B2M* и *CIITA* и моноаллельный индел в гене *PVR* при сохранении аллеля дикого типа. Относительная экспрессия генов *B2M*, *CIITA* и *PVR* составила 0,18, 0,23 и 0,66 от контроля; TRA-1-60 экспрессировали 88,4% клеток. Кариотип — 46, XX[20], клональные аберрации не выявлены.

Получены кандидатные линии иПСК с функциональной инактивацией генов *B2M* и *CIITA* и частичным снижением поверхностной экспрессии PVR/CD155. Для получения линии с биаллельным нокаутом гена *PVR* необходим дополнительный клональный скрининг с последующей оценкой иммуногенности в тестах с аллогенными Т- и NK-клетками.

РОЛЬ ПРОФИБРОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ФОРМИРОВАНИИ ФЕНОТИПА МИОФИБРОБЛАСТОВ

Ахременков А.В.[1*], Черкашина О.Л.[1], Аболин Д.С.[1], Воротеляк Е.А.[1], Калабушева Е.П.[1]

1. *ФГБУН «Институт Биологии Развития имени Н.К.Кольцова РАН», Москва, Россия*

E-mail:* akhremenkovav@my.msu.ru

Введение. Культивирование фибробластов дермы для получения кожных эквивалентов на лабораторном пластике запускает пути механотрансдукции и ведёт к формированию фенотипа с коммитированностью к рубцеванию, что впоследствии будет приводить к фибротизации. Одни из центральных регуляторов, связывающих биохимические и механические стимулы – паралоги YAP1 и WWTR1. Активация YAP1 у мыши приводит к повышению уровня экспрессии *DPP4*, *TAGLN* и других маркеров фиброза,

поэтому целью работы было оценить вклад паралогов и их мишеней в формирование профибротического фенотипа.

Методы. Нокдаун *YAP1*, *WWTR1*, *DPP4* в фибробластах рубца человека проводили малыми шпилечными РНК, после чего оценивали контрактильную способность фибробластов, пролиферацию, морфологию и фенотип клеток методами ИЦХ, экспрессию профибротических генов — ПЦР.

Результаты. При культивировании в 2D YAP1 и WWTR1 локализованы в ядре. Такая локализация паралогов сохраняется при переносе клеток в коллагеновые гидрогели и ведёт к формированию пула клеток, способных контрактировать матрикс за счёт экспрессии сократительных белков (αSMA, TAGLN).

Нокдаун *YAP1*, *WWTR1* и *DPP4* приводил к снижению контрактильной способности клеток. При равных диаметрах коллагеновых гидрогелей в результате нокдауна *WWTR1* и *DPP4* число клеток в поле зрения различалось вдвое. В отсутствии пролиферации это говорит о разных причинах изменения диаметра коллагеновых гидрогелей. Содержание сократительного белка TAGLN было снижено только при нокдауне *WWTR1,* что также сопровождалось наибольшим содержанием лептина — маркера адипогенной дифференцировки, происходящей при регрессии рубцовой ткани.

Выводы. Активация паралогов на пластике приводит к рубцеванию. В данной работе благодаря нокдаунам мы выявили разнонаправленное действие YAP1 и WWTR1: в то время как YAP1 отвечает за формирование сократительного аппарата, WWTR1 – за поддержание фенотипа миофибробластов. Контроль активации данного каскада необходимо учитывать при проектировании тканеинженерных конструкций для заместительной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-74-30015- П).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ PLGA, КОЛЛАГЕНА И КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Багдасарян А.А.[1]*, Вишнякова П.А.[1], Киселева В.В.[1], Илларионова А.Н.[1], Усатов Н.С.[1], Трифанова Е.М.[2], Дунаев А.Г.[2], Миронов А.В.[2], Романова И.В.[3], Ельчанинов А.В.[1,4], Фатхудинов Т.Х.[1,4]

1. *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулаков», Москва, Россия*
2. *Институт фотонных технологий Курчатовского комплекса кристаллографии и фотоники Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия*
3. *АО «Медтехнопроект», Москва, Россия*
4. *Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия*

E-mail: aidabagdasaryin@gmail.com*

Рак молочной железы занимает ведущее место в структуре онкологической заболеваемости женщин, а мастэктомия сохраняет значительную долю хирургических вмешательств. Перспективным направлением реконструкции являются 3D-биорезорбируемые скаффолды.

Целью работы была разработка экспериментальной основы для создания тканеинженерной конструкции молочной железы путем оптимизации протокола выделения клеток стромально-васкулярной фракции жировой (СВФ) ткани и сравнительной оценки биосовместимости и резорбции скаффолдов на основе PLGA, коллагена I типа и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ).

Исследование выполнено на 12 крысах линии Sprague–Dawley. Клетки жировой ткани и СВФ окрашивали DiO, анализировали методом проточной цитометрии и иммуноцитохимии с антителами к CD34, CD44 и CD31. Методами 3D-печати и электроспиннинга изготовлены скаффолды из PLGA, коллагена I типа и КМЦ. Животных выводили из эксперимента через 1 и 3 месяца. Проводили гистологическое исследование зоны имплантации, печени, селезенки и тимуса; через 1 месяц выполняли обзорную гистологию самих скаффолдов.

Получены и охарактеризованы клеточные культуры из жировой ткани. Через 1 и 3 месяца признаки системной токсичности и инфекционных осложнений отсутствовали. Вокруг 3D-скаффолдов из PLGA формировалась соединительнотканная капсула, отмечались сосуды и прорастание ткани внутрь скаффолда, однако уже через 1 месяц выявлялись деформация и изменение геометрии. Нетканый PLGA-материал окружала тонкая капсула; внутри определялись фибриллярные структуры, фибробласты и сосуды без воспалительной инфильтрации. Коллагеновые скаффолды наиболее полно прорастали соединительной тканью, содержащей клетки фибробластического ряда, сосуды и волокнистый компонент. КМЦ характеризовалась наиболее быстрой резорбцией уже к 1 месяцу, хотя в зоне имплантации также формировалась васкуляризированная соединительная ткань. Молекулярная масса PLGA снижалась порядка 10% через 1 месяц и 47% через 3 месяца.

PLGA обладает контролируемой резорбцией и поддерживает васкуляризацию, но требует оптимизации механических свойств. Коллаген обеспечивает выраженное тканевое прорастание, тогда как быстрая деградация КМЦ ограничивает ее применение для длительного сохранения формы.

Работа выполнена при поддержке государственного задания «Разработка 3D-биорезорбируемого скаффолда для реконструкции молочной железы» № 125050605838-9.

КЛЕТОЧНЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ КАЛЬЦИФИКАЦИИ ПРИ СИНДРОМЕ СИНГЛТОНА–МЕРТЕНА

Беляева А.А.[1*], Кучур П.Д.[1], Смирнова Д.В.[1], Сердюкова Д.А.[1], Перегудина О.Л.[2], Васичкина Е.С.[2], Костарева А.А.[1], Малашичева А.Б.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: anna.belyaeva97@mail.ru*

Синдром Синглтона-Мертена (ССМ) – редкая аутосомно-доминантная интерферонопатия I типа, вызванная патогенными вариантами в генах *DDX58* или *IFIH1*. Заболевание сопровождается остеопорозом, псориазом и кальцификацией клапанов сердца, сосудов и внутренних органов. Для изучения клеточных механизмов кальцификации мы получили производные индуцированных плюрипотентных клеток (иПСК) пациента с ССМ и провели их транскриптомный анализ.

ИПСК пациента с ССМ и здорового донора дифференцировали в мезенхимные стромальные клетки (иМСК). Полученные иМСК имели характерный иммунофенотип и были положительны по виментину. Транскриптомный анализ выявил в клетках пациента изменения, связанные с ремоделированием внеклеточного матрикса, включая повышение экспрессии коллагенов и активацию программ клеточной адгезии, миграции и механочувствительности.

Также были получены эндотелиальные клетки иПСК пациента (иЭК) с ССМ и здоровых доноров. В клетках пациента выявлена активация транскриптомных программ, связанных с врождённым иммунитетом, интерфероновым ответом, инфламмасомой и MHC II. Одновременно были подавленны транскрипционные программы внеклеточного матрикса и клеточной адгезии.

Эндотелиальные производные иПСК пациента и здорового донора сокультивировали с интерстициальными клетками клапана (ИКК) и гладкомышечными клетками аорты (ГМК). В системе с ИКК эндотелиальные клетки пациента с ССМ вызывали изменения программ воспалительного ответа, клеточного стресса, оссификации, ангиогенеза и ремоделирования внеклеточного матрикса. В сокультуре с ГМК выраженной воспалительной активации не наблюдалось, однако изменялись пути оссификации, Notch-сигналинга и организации внеклеточного матрикса. Общие изменения матриксных программ указывают на влияние эндотелиальных клеток пациента с ССМ на оба типа клеток-мишеней.

Полученные данные позволяют предположить, что хроническое воспаление формирует микроокружение, способствующее развитию патологической кальцификации, а различные типы клеток вносят в этот процесс взаимодополняющий вклад через иммунную активацию, ремоделирование внеклеточного матрикса и изменение остеогенных программ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-15-00280).

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИГЛИСТЫХ МЫШЕЙ ACOMYS К ПРОФИБРОТИЧЕСКИМ СТИМУЛАМ НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ОПРЕДЕЛЯЮЩИМ ФАКТОРОМ РАЗВИТИЯ ФИБРОЗА *IN VIVO*

Бирюкова В.Н.[1*], Бутузова Д.А.[1], Шилова А.А.[1], Виговский М.А.[1], Карманова Д.Т.[1], Попов В.С.[1], Ефименко А.Ю.[1], Басалова Н.А.[1]

1. *Медицинский научно-образовательный институт Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: biryukovavn@my.msu.ru*

При фиброзе функциональная ткань органа замещается внеклеточным матриксом, синтезируемым стромальными клетками; в легких данный процесс зачастую приводит к необратимой дисфункции. В отличие от большинства млекопитающих, мыши рода *Acomys* способны восстанавливать ткани в ответ на повреждение без формирования устойчивого фиброза, однако особенности ответа их стромальных клеток на повреждение малоизучены.

Цель исследования - выявить особенности активации стромальных клеток *Acomys* в ответ на профибротические стимулы, которые могут определять восстановление ткани легких без развития фиброза.

Повреждение лёгких индуцировали интратрахеальным введением блеомицина (15 Ед/кг) самцам *Acomys*. Забор лёгких выполняли на 3, 7, 14, 28, 60 сутки (n=3–5). Представленность активированных стромальных клеток (FAPα) и миофибробластов (α-SMA) оценивали иммуногистохимически в сравнении с ранее полученными данными *Mus* (C57BL/6). Для оценки чувствительности стромальных клеток к профибротическому стимулу проводили их выделение из лёгких *Acomys* и *Mus* и TGF-β1-индуцированную дифференцировку в миофибробласты, оценка эффективности методами иммуноцитохимии, вестерн-блота и функциональных тестов.

При повреждении лёгких у *Acomys* наблюдается транзиторная активация стромальных клеток: количество миофибробластов и FAPα+ клеток увеличивается к 7 суткам, но уже к 14 дню снижается до единичных клеток. У *Mus* обе популяции остаются многочисленными не менее 4 месяцев, что сопровождается патологическим ремоделированием ткани. Интересно, что стромальные клетки лёгких *Acomys* оказались чувствительны к TGF-β. Их дифференцировка в миофибробласты сопровождается синтезом α-SMA и винкулина и формированием комплекса α-SMA+ стресс-фибриллы-фибронексусы. Несмотря на низкий базальный уровень этих белков, относительное увеличение их экспрессии у *Acomys* более выражено, чем у *Mus* (α-SMA - в 3 раза, винкулин - в 112 раз).

Таким образом, стромальные клетки *Acomys* чувствительны к профибротическим стимулам как *in vivo*, так и *in vitro*, и реализуют типичный для клеток млекопитающих ответ на повреждение. Однако принципиально иная регуляция поведения стромальных клеток со стороны микроокружения предотвращает патологическое фиброзирование, предположительно, обеспечивая быстрое и эффективное ремоделирование ткани. Выявление опосредующих данные эффекты молекулярных и клеточных механизмов перспективно для поиска подходов к реверсии фиброза у человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-75-00037).

ИНГИБИТОР EPAC1 ESI-09 НИВЕЛИРУЕТ АНТИОСТЕОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ АДРЕНАЛИНА, БЛОКИРУЯ НЕКАНОНИЧЕСКУЮ АКТИВАЦИЮ ЧЕРЕЗ ADRB2

Бородий В.Д.[1*], Краснова О.А.[1], Неганова И.Э.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: lera.borodiy.2002@mail.ru*

Остеопороз – метаболическое заболевание скелета, характеризующееся снижением плотности и нарушением структуры костей, что увеличивает риск переломов. Заболевание долгое время протекает бессимптомно, поэтому важен поиск генетических маркеров для ранней диагностики. Один из них – полиморфизм *ADRB2* rs1042713 (c.46G>A, p.Gly16Arg). Ранее показано, что адреналин не активирует классический сигнальный путь β2-адренорецептора (PKA/CREB), подавляя остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Предполагается, что антиостеогенный эффект адреналина опосредуется неканоническими сигнальными путями. Одним из таких путей является EPAC1 – альтернативная мишень цАМФ, роль которой в остеогенезе практически не изучена.

Цель работы – оценить вклад EPAC1 в антиостеогенном эффекте адреналина и эффективность его ингибитора ESI-09.

МСК выделяли из костных эксплантатов от пациентов с генотипами ADRB2 G/G и A/A. Клетки культивировали в стандартной ростовой среде, затем индуцировали остеогенную дифференцировку в присутствии 50 нМ адреналина, а также с добавлением ингибитора ESI-09. Минерализацию внеклеточного матрикса оценивали окрашиванием Ализариновым красным S на 21 день.

При оценке минерализации на 21 день остеогенной дифференцировки было обнаружено, что адреналин снижал интенсивность окрашивания Ализариновым красным S в клеточных культурах, полученных от носителей A-аллеля, что указывает на

подавление последних этапов остеогенеза. Добавление ESI-09 повышало уровень минерализации в тех же условиях, что свидетельствует о нивелировании антиостеогенного эффекта адреналина. В пациент-специфических клеточных линиях с генотипом G/G адреналин не оказывал значимого влияния на минерализацию, и эффект ESI-09 также отсутствовал.

Полученные данные позволяют предположить, что адреналин реализует свой антиостеогенный эффект через неканонический путь с участием EPAC1, и этот механизм проявляется только у носителей A-аллеля полиморфизма *ADRB2* rs1042713.

Результаты показывают, что EPAC1 участвует в реализации антиостеогенного эффекта адреналина через неканонический сигнальный путь ADRB2, причём этот механизм проявляется только в клеточных линиях от носителей A-аллеля полиморфизма *ADRB2* rs1042713. Блокада EPAC1 селективным ингибитором ESI-09 нивелирует подавление остеогенеза, что указывает на роль EPAC1 как ключевого посредника антиостеогенного действия адреналина у носителей A-аллеля.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-25-00972).

ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ КОЛЛАГЕНОВ I И V ТИПОВ НА СТРУКТУРНЫЕ СВОЙСТВА КОМПОЗИТНЫХ ПЛЕНОК

Букаткина Е.В.[1*], Нащекин А.В.[2], Нащекина Ю.А[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБУН «Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: ekaterina_bukk@mail.ru*

Заболевания роговицы являются одними из главных причин необратимого снижения зрения. Для создания искусственной роговицы необходимо воспроизвести не только биохимический состав стромы, но и ее физическую организацию. Строма роговицы состоит из коллагена I и V типа. Согласно исследованиям, коллаген V, имеющийся в роговице, не только регулирует толщину фибрилл, состоящих из коллагена I, но и ограничивает их рост.

Целью настоящего исследования является исследование влияния коллагена V типа на способность коллагена I типа формировать гибридные фибриллы. В работе использовали водные растворы коллагена I и V в различном соотношении. Фибриллогенез инициировали добавлением буферного раствора HEPES. Получили пленки с разным соотношением коллагенов, исследовали их структурные характеристики методом сканирующей электронной микроскопии. Кинетику сборки оценивали по изменению оптической плотности при 310 нм в течение 20 минут.

По данным кинетических измерений, увеличение доли коллагена V приводило к снижению конечной оптической плотности, что свидетельствует об уменьшении доли фибрилярного коллагена. Полученные изображения сканирующей электронной микроскопии демонстрируют, что увеличение доли коллагена V приводит к уменьшению диаметра фибрилл.

Таким образом, исследование зависимости свойств фибрилл от соотношения коллагенов I и V позволяет подойти к созданию матриксов с контролируемой структурой, позволяет управлять как

кинетикой сборки, так и конечной архитектурой фибрилл. Это открывает путь к созданию матриксов с оптимальными для роговицы свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-74-20120-П).

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И СВОЙСТВ МЕХАНОУПРАВЛЯЕМЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ PIEZO1 В НОРМАЛЬНЫХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЁННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

Буянова А.А.[1,2*], Руднева З.М.[1], Чубинский-Надеждин В.И.[1], Князева В.Ю.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: Nastpdp11@gmail.com*

Поддержание нормального функционирования эндометрия и его структуры обеспечивает популяция эндометриальных мезенхимных стволовых/стромальных клеток (эМСК), которая активно пролиферирует, самообновляется и дифференцируется. Механотрансдукция является важным этапом данных процессов и может осуществляться с участием кальций-проводящих механоуправляемых ионных каналов Piezo1. Нарушение механозависимой сигнализации эМСК, в частности изменение в функционировании каналов Piezo1, может играть ключевую роль в возникновении и прогрессировании заболеваний эндометрия.

Цель нашего исследования – сопоставить особенности функционирования и роль механоуправляемых ионных каналов Piezo1 в эМСК в норме и при патологии (полип и миома). С

помощью молекулярно-биологических методов (ОТ-ПЦР, иммунофлуоресцентное окрашивание) и методом измерения внутриклеточной концентрации кальция, было показано присутствие Piezo1 в плазматической мембране эМСК, выделенных при патологиях. Добавление селективного химического активатора каналов Piezo1 – Yoda1 вызывало увеличение интенсивности свечения флуоресцентного кальциевого зонда Fluo8 в клетках, что свидетельствует о входе ионов кальция через Piezo1 из внеклеточной среды в цитоплазму. С помощью метода патч-кламп в конфигурации cell-attached на уровне одиночных ионных токов была показана активность одиночных каналов Piezo1 в плазматической мембране патологических эМСК (полип), биофизические характеристики которых совпадают с Piezo1, зарегистрированными ранее в эМСК в норме. Мы наблюдали феномен сопряженной активации токов: в ответ на приложение механического стимула активировались кальций-проводящие механоуправляемые каналы, которые, в свою очередь, активировали кальций-активируемые калиевые каналы. Таким образом, в плазматической мембране эМСК, выделенных при сопутствующей патологии (полипе), присутствуют механоуправляемые каналы Piezo1, способные формировать функциональные комплексы (предположительно) с кальций-активируемыми калиевыми каналами большой проводимости (BK-каналами). Полученные результаты демонстрируют, что в эМСК при полипе сохраняется функциональная активность каналов Piezo1, что указывает на сохранность первичного звена механотрансдукции при патологии, однако открывает перспективы для изучения внутриклеточных сигнальных каскадов, нарушение которых может обусловливать патогенез заболеваний эндометрия и дальнейшего изучения других патологий (миомы).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-75-00029).

РОЛЬ NANOG В ХОДЕ ЭНТОДЕРМАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Василин В.В.[1*], Зиновьева А.С.[1], Гордеев М.Н.[2], Петренко Е.Е.[3], Аксёнов Н.Д.[1], Томилин А.Н.[1], Бахмет Е.И.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Институт эволюции, университет Хайфы, Хайфа, Израиль*
3. *Факультет биологии, Технион – Израильский технологический институт, Хайфа, Израиль*

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

Nanog является одним из основных транскрипционных факторов, поддерживающих плюрипотентное состояние клеток в первые дни развития эмбриона. Его максимальная экспрессия наблюдается примерно на 4.5 сутки, но уже через день после этого, в момент имплантации, она резко снижается. Тем не менее, Nanog частично реактивируется в период гаструляции, и всё больше исследований подтверждают, что данный фактор не только перестаёт поддерживать плюрипотентность, а напротив, выступает её репрессором и индуцирует дифференцировку. В нашей работе, используя dTAG-опосредованную деградацию Nanog, мы рассмотрели его влияние на развитие клеток в мезоэнтодермальном направлении.

Для исследования использовали клеточную линию Ndeg6.6 с индуцируемой деградацией Nanog. Дифференцировку проводили на модели эмбриональных телец. Экспрессию ключевых маркеров плюрипотентности и мезоэнтодермы оценивали с помощью RT-qPCR и методом проточной цитометрии с использованием репортерной линии Foxa2-T2A-EGFP/Bra-T2A-tagBFP. Также был проведён иммунноцитохимический анализ.

После добавления dTAG значительное снижение уровня Nanog наблюдалось уже через полчаса и держалось на таком уровне не менее суток. На фоне данного эффекта уменьшилась экспрессия

Foxa2 и Sox17, основных маркеров энтодермы. Кроме того, заметна тенденция к снижению экспрессии маркеров первичной полоски T (Brachyury) и Eomes. Однако, несмотря на явное влияние Nanog на формирование мезоэнтодермы, иммунноцитохимический анализ показал, что данный фактор не блокирует дифференцировку клеток в этом направлении полностью.
Данные результаты позволяют подтвердить участие Nanog в энтодермальной спецификации.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 23-75-10096-П).

ФОТООТВЕРЖДАЕМЫЕ ГИДРОГЕЛИ С АПКОНВЕРТИРУЮЩИМИ НАНОЧАСТИЦАМИ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО РОСТА КЛЕТОК

Волина Е.В.[1,3*], Сопова А.А.[2], Акасов Р.А.[1,2,3], Егорова Т.В.[1,3], Демина П.А.[2,3], Генералова А.Н.[2]

1. *Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия*
2. *ФГБУН ГНЦ ИБХ РАН, Москва, Россия*
3. *ГНЦ РФ ФГБНУ «РНЦХ имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия*

E-mail: katherina.volina@gmail.com*

Апконвертирующие наночастицы (АН), способные преобразовывать свет ближнего инфракрасного диапазона (БИК) в видимое и УФ-излучение, представляют собой перспективный инструмент тканевой инженерии, в т.ч. для создания материалов, обеспечивающих направленный рост клеток. При этом они могут выполнять двойную функцию: концерсию БИК света в свет, способный активировать фотоинициаторы (ФИ) для фотополимеризации, а также могут модифицировать поверхность материала, облегчая адгезию клеток. Целью данного исследования

стала оценка биосовместимости (фотоотверждаемого) гидрогеля на основе желатина и/или полиэтиленгликоль диакрилата (ПЭГ-ДА) с включенными АН со структурой ядро-оболочка $NaYF_4:Yb^{3+},Tm^{3+}$-$NaYF_4$; в качестве фотоинициатора для реакции сшивки геля использовался LAP (фенил-2,4,6-триметилбензоилфосфинат лития). Было показано, что фотоактивация LAP на длине волны 365 нм позволяла получать скаффолды заданной формы из 12% желатина и 11% ПЭГ-ДА, при этом в ходе реакции фотосшивания АН имели тенденцию к движению на поверхность гидрогеля. С использованием hTERT- иммортализованных мезенхимальных стволовых клеткок человека было показано, что фотоотверждаемые гидрогели не проявляли токсичности (>90% выживаемости в экстракт-тесте). Было продемонстрировано, что гидрогели с включенными АН проявляли большую клеточную адгезию, которая вероятно объяснялась наличием необходимого уровня шероховатости поверхности материала. С помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) мы показали, что клетки активно поглощают частицы в процессе ремоделирования гидрогеля. Также при помощи окраски клеток тетразолиевым красителем нами был показан более упорядоченный и направленный рост клеток на гидрогелях с АН по сравнению с контрольными гидрогелями, не содержащими наночастицы.

Таким образом, гидрогели на основе 12% желатина и 11% ПЭГ-ДА с включенными АН $NaYF_4:Yb^{3+},Tm^{3+}$-$NaYF_4$ цитосовместимы и являются перспективной моделью для дальнейшего исследования возможности обеспечения направления роста клеток. Такие сложно-структурированные скаффолды могут быть использованы при создании тканеинженерных конструктов тканей и органов, где важен направленный рост клеток, в том числе в ангиогенезе.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-12-00514).

РОЛЬ АКТОМИОЗИНОВОГО СОКРАЩЕНИЯ И TGF-β В КОНТРАКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Глазьева В.С.[1*], Водопетова М.А.[1], Макаревич П.И.[1], Александрушкина Н.А.[1]

1. *Центр регенеративной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: glazievavalentina@mail.ru*

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются одним из наиболее перспективных источников для создания тканеинженерных конструкций в регенеративной медицине. Клеточные пласты (КП) из МСК — конструкции, состоящие из клеток и наработанного ими внеклеточного матрикса (ВКМ), — обладают ключевым преимуществом перед другими подходами клеточной терапии: высокой жизнеспособностью клеток и наличием заякоренных сигнальных факторов и компонентов ВКМ, обеспечивающих своевременную реализацию терапевтических эффектов при трансплантации. КП также рассматриваются как модель ранозаживления путем организации грануляционной ткани без формирования рубца. Однако широкое применение КП ограничивается отсутствием единого протокола их получения в заданные сроки, а также спонтанной контракцией, ведущей к потере образцов.

Классически актомиозиновое сокращение связывают со встраиванием αГМА (альфа-гладкомышечного актина) в стресс-фибриллы цитоскелета, что обеспечивает генерацию сократительного усилия, передаваемого через фокальные контакты на ВКМ и соседние клетки, — и предполагалось, что именно дифференцировка стромальных клеток в миофибробласты с экспрессией αГМА лежит в основе контракции КП. Однако нами было показано, что в ряде культур этот механизм не является определяющим: контракция КП не всегда сопряжена с экспрессией

αГМА. Для оценки роли актомиозинового сокращения в сроках сборки КП было предложено культивирование МСК в условиях трансформирующего фактора роста-бета (TGF-β), являющегося основным индуктором миофибробластной дифференцировки. Было показано, что культивирование в условиях TGF-β с первых суток приводило к организации большего количества очагов повышенной плотности клеток, напоминающих конденсацию мезенхимы при созревании зародышевых тканей, что впоследствии завершалось контракцией КП. При этом добавление TGF-β на финальных этапах культивирования не приводило к более ранней контракции КП по сравнению с контролем, что подтверждает вклад других процессов в созревание и сборку КП.

Таким образом, КП представляют собой не только перспективный биомедицинский клеточный продукт, но и уникальную модель изучения поведения и дифференцировки клеток in vitro в составе минимального самоорганизующегося эквивалента живой ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-25-00096).

РОЛЬ Т-КАДГЕРИНА В СОСТАВЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МСК В РЕГУЛЯЦИИ АДИПОГЕНЕЗА И МЕТАБОЛИЗМА ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

Дзреян В.А.[1*], Климович П.С.[1], Сысоева В.Ю.[1], Головкин А.С.[2], Рубина К.А.[1]

1. *НИЛ Морфогенеза и репарации тканей МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
2. *Институт молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ имени В. А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: dzreyan2016@mail.ru*

Внеклеточные везикулы (ВВ), секретируемые адипоцитами и другими клетками жировой ткани, играют ключевую роль в

регуляции системного метаболизма. При метаболических заболеваниях нарушаются секреция и функции ВВ, что усугубляет общую метаболическую дисфункцию. *CDH13* (Т-кадгерин), являясь рецептором адипонектина, важнейшего адипокина, продуцируемого жировой тканью и оказывающего системное действие на метаболизм, может опосредовать взаимодействие ВВ с клетками-мишенями в жировой ткани, тем самым регулируя процессы обновления и дифференцировки клеток.

Для изучения молекулярных механизмов участия Т-кадгерина в паракринной регуляции метаболизма жировой ткани ВВ были выделены методом ультрафильтрации из кондиционированной среды МСК жировой ткани человека с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина и комплексно охарактеризованы в соответствие с рекомендациями Международного общества внеклеточных везикул (ISEV).

Иммуноблоттинг показал, что фракция везикул от МСК с гиперэкспрессией Т-кадгерина (ВВ Т+) содержала максимальный уровень Т-кадгерина в составе везикул. При этом гиперэкспрессия Т-кадгерина снижала секрецию ВВ клетками МСК.

В ходе адипогенной дифференцировки под действием ВВ Т+ наблюдалось выраженное подавление *PPARγ* — главного мастер-регулятора адипогенеза — на фоне повышения остеогенного маркера *RUNX2*. При этом уровень мРНК регуляторов адипогенеза *KLF5* и *GATA2* в большинстве случаев снижался под действием ВВ Т+.

Таким образом, Т-кадгерин в составе ВВ участвует в регуляции адипогенеза и метаболизма жировой ткани, действуя как негативный регулятор дифференцировки через передачу сигнала с помощью внеклеточных везикул, модулируя их активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания (проект № №03р-23/110-03).

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ВЕЗИКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ

Дьячкова У.Д.[1*], Рогачев П.Н.[1], Басалова Н.А.[1], Виговский М.А.[1], Ефименко А.Ю.[1], Григорьева О.А.[1]

1. *Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: Dyachkovaud@my.msu.ru*

Внеклеточные везикулы мезенхимных стромальных клеток (ВВ) содержат в составе микроРНК-29 и -129, регулирующие TGFβ-1-индуцированную дифференцировку фибробластов (ФБ) в миофибробласты – ключевой процесс при развитии фиброза (Basalova et al., 2023). TGFβ-1 запускает активацию стромальных клеток и накопление белка активированных ФБ (FAPa), а затем приводит к дифференцировке в миофибробласты. На модели блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей интратрахеальное (ИТ) введение ВВ способно подавлять развитие фиброза легких и приводить к его разрешению (Basalova et al., 2023). Полученные данные легли в основу для разработки оригинального биологического препарата (БП) на основе ВВ человека. Для оценки параметров биораспределения ВВ мы использовали модель блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей. При ИТ введении ВВ, меченых флуоресцентными красителями PKH26/DiR, большая часть сигнала обнаруживается через 3 часа в легких, а также незначительно в печени и селезенке. Для определения клеточных мишеней ВВ при ИТ введении был разработан подход для количественной оценки солокализации меченых ВВ. Используя библиотеку открытого кода Python OpenCV, мы обрабатывали изображения, полученные методом иммуногистохимического

анализа криосрезов легких, меченых специфическими антителами. Разработанная программа определяла область, занимаемую сигналом от ВВ, и область, занимаемую сигналом от клеточного маркера, и далее оценивала степень солокализации ВВ и клеток, содержащих определенный маркер, путем сравнения интенсивности сигнала в обоих каналах. Полученные автоматически данные валидировали путем ручного подсчета. Через 30 минут после ИТ введения около 40% от всех ВВ, солокализованных с клетками, оказывается в FAPa+клетках, а через 3 часа это количество снижается в два раза. FAPa – маркер активированных ФБ, находящихся на периферии фибротических фокусов, поэтому солокализация с ним указывает на захват ВВ активированными стромальными клетками на ранних сроках после введения. Разработанный нами подход к автоматическому подсчету может быть использован для оценки биораспределения БП на основе ВВ и липосом, определения их клеточных мишеней и изучения солокализации меченных частиц с определенными клеточными типами. Кроме того, автоматический подсчет снижает субъективность оценки, хотя и требует валидации и корректировки на начальных этапах подсчета для увеличения точности распознавания ВВ и клеточных маркеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 23-15-00198-П).

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ ФОРМЫ И ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ВАНАДИЯ ИЗ ГИДРОКСИАПАТИТА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Жижина К.П.[1, 2*], Рыжов А.П.[3], Александрова С.А.[1], Дарвиш Д.М.[1], Фадеева И.В.[4]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт», Санкт-Петербург, Россия*
3. *ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия*
4. *ФГБУН «Институт металлургии и материаловедения имени А.А. Байкова РАН», Москва, Россия*

E-mail: ksen_pav@mail.ru*

Ванадийсодержащие гидроксиапатиты (ГА) перспективны для регенеративной медицины благодаря сочетанию остеогенной и антибактериальной активности. Однако их функциональные свойства могут зависеть от степени окисления ванадия (V^{4+} или V^{5+}) и его локализации в структуре апатита. Целью работы было сравнение цитотоксичности ванадат- (VO_4-ГА) и ванадилсодержащего (VO-ГА) ГА по отношению к мезенхимным стромальным клеткам человека с учетом кинетики высвобождения ванадия.

Исследовали чистый ГА, VO_4-ГА и VO-ГА, полученные осаждением с последующим прокаливанием при 400 °C. Содержание ванадия в VO_4-ГА было примерно на порядок выше, чем в VO-ГА. Для оценки высвобождения ванадия образцы выдерживали в физиологическом растворе; на 1, 3 и 14 сут определяли концентрацию ванадия методом АЭС-ИСП. На 3 сут для VO_4-ГА она составляла 1,92 ± 0,04 мкг/мл, для VO-ГА – 0,173 ± 0,007 мкг/мл; на 14 сут – 3,64 ± 0,05 и 0,353 ± 0,007 мкг/мл соответственно.

Цитотоксичность образцов оценивали МТТ-тестом по метаболической активности (МА) клеток M-FetMSC (ЦКП «Коллекции культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург) после 24-часовой инкубации с экстрактами ГА. Экстракты получали выдерживанием образцов (0,1 г/мл) в DMEM/F-12 в течение 3 сут при 37 0С; далее готовили разведения 1:2, 1:20 и 1:200. Экстракт чистого ГА не влиял на МА клеток. Экстракты VO_4-ГА с разведением 1:0, 1:2, 1:20 и 1:200 снижали МА до 48, 58, 85 и 83% соответственно. Экстракты VO-ГА имели менее выраженную токсичность: снижение МА наблюдалось только для неразведенного экстракта 1:0 и для разведения 1:2, где МА составила 60% и 75%.
Таким образом, оба образца проявляли концентрационно-зависимую цитотоксичность, но с разными закономерностями. При сопоставимой расчетной концентрации ванадия (0,009 мкг/мл) VO_4-ГА оставался цитотоксичным даже при разведении 1:200, тогда как для VO-ГА цитотоксичность исчезала уже при 1:20. Это указывает на то, что цитотоксический эффект определяется не только количеством ванадия в среде, но и, вероятно, его химической формой: V^{5+} в VO_4-ГА и V^{4+} в VO-ГА.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (проект № FMFU-2026-0012).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ *APOSTICHOPUS JAPONICUS* (SELENKA, 1867) ПОСЛЕ ЭВИСЦЕРАЦИИ

Завальная Е.Г.[1*]

1. *Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия*

E-mail: eugenia_94@inbox.ru*

Исследование феномена регенерации на классических модельных объектах позвоночных ограничено в виду отсутствия у них выраженных способностей к репаративной регенерации. Среди групп животных, эволюционно наиболее близких к хордовым, представители типа Иглокожие обладают отличительными восстановительными способностями. В частности, дальневосточный трепанг (*Apostichopus japonicus*) использует особый защитный механизм – эвисцерацию, для ответа на стресс. В ходе эвисцерации животное выбрасывает внутренние органы: пищеварительный тракт, водные легкие, а также целомическую жидкость (ЦЖ) с их последующей полной регенерацией.

Механизм восстановления клеток целомической жидкости, формирующих иммунную системы иглокожих, остается неизученным. В качестве гипотетического предшественника новых целомоцитов часто рассматриваются стволовые клетки, в целом не характерные для иглокожих. В данном исследовании для идентификации предполагаемых клеток-предшественников, участвующих в восстановлении клеточного состава целомической жидкости *Apostichopus japonicus* после эвисцерации, использовали ген *piwi*.

В целомической жидкости трепанга были обнаружены разные функциональные морфотипы клеток: лимфоциты, амебоциты, сферулоциты разных размеров и степени гранулированности. Анализ динамики целомоцитов после эвисцерации показал, что восстановление клеточного состава ЦЖ происходит за счет клеток небольшого размера, количество которых резко возрастает в течение

первого часа регенерации с последующей их дифференцировкой в функционально активные клетки. Восстановление соотношения разных субпопуляций целомоцитов является быстрой реакцией и завершается уже через 24 ч после эвисцерации.
Идентифицированные с помощью антител клетки, содержащие белок «стволовости» Piwi, характеризуются малым размером (меньше 5 мкм) и высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Динамика экспрессии *piwi* после эвисцерации согласуется с динамикой субпопуляции мелкоразмерных целомоцитов, что позволяет считать данные клетки стволовыми, обладающих мульти- или плюрипотентностью, и активно вовлеченными в восстановление иммунных клеток целомической жидкости.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-44-02092).

ФОРМИРОВАНИЕ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА И КОЛЛАГЕНА II ТИПА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

Загоскина Д.М.[1,2*], Нащекина Ю.А.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский государственный технологический институт, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: dashamoosse@gmail.com*

Коллаген II типа является важным структурным белком внеклеточного матрикса хрящевой ткани. Он влияет на морфологию и жизнедеятельность специфичных для хряща клеток – хондроцитов. Поэтому для восстановления хрящевой ткани в рамках тканевой инженерии целесообразно использовать коллаген II типа, в том числе из-за его биосовместимости. Однако ограничения в

механических характеристиках этого белка снижают потенциал его использования в регенеративной медицине. Еще одним распространенным биоматериалом, используемым для заживления хряща, является альгинат, который обладает рядом достоинств – биодеградируемостью, структурной схожестью с внеклеточным матриксом, а также прекрасными упругими свойствами. Однако его недостатком является отсутствие сайтов связывания с клетками. Совместное использование двух биополимеров может помочь преодолеть эти недостатки, тем самым улучшив взаимодействие клеток с матрицей.

Коллаген II типа был выделен из грудных хрящей цыплят-бройлеров посредством ферментативного гидролиза. Белок в виде осадка был получен высаливанием. Далее коллаген претерпел очистку посредством диализа и был высушен.

Для анализа выделенного белка были проведены SDS-PAGE электрофорез и иммуноблоттинг. В результате были обнаружены α-цепи молекулярной массой 120-150 кДа, что соответствует литературным данным о структуре коллагена II типа. Методом иммуноблотинга была подтверждена принадлежность выделенного белка к коллагену II типа. На основе выделенного белка и альгината сформированы матрицы в виде пленок. Методами ИК-спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии обнаружили фибриллы коллагена II типа, что подтверждает его нативность и способность к самосборке *in vitro*. Данные МТТ-теста не выявили цитотоксичности полученных матриц. При анализе морфологии клеток методом конфокальной микроскопии было показано, что культивируемые мезенхимные стромальные клетки на всех образцов имеют веретеновидную вытянутую форму, характерную для этого типа клеток, что подтверждает совместимость приготовленных пленок по отношению к данной клеточной культуре. Полученные пленки являются перспективными материалами для культивирования и трансплантации клеток в область повреждения хрящевой ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-74-20120-П).

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНО-ЗАСЕЛЕННЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ

Зайкова Д.М.[1,2*], Волик Т.В.[2], Меньщиков А.А.[1,2], Чикалкин Н.С.[2], Кононова Д. В.[3], Шевченко А.И.[2], Цвелая В.А.[3], Блинова Е.В.[1], Захарова И.С.[1,2], Парфенов В.А.[1,2]

1. *Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия*
2. *Акционерное общество «Научно-исследовательский институт технической физики и автоматизации», Москва, Россия*
3. *ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт», Долгопрудный, Россия*

E-mail:**dzaykova1@gmail.com

Сердечно-сосудистые заболевания остаются одной из ведущих причин смертности и инвалидизации населения. В данную статистику входят заболевания сосудов, связанные с дефектами эндотелия сосудистой стенки. Для решения этой проблемы принято реконструировать поражённый участок сосуда с помощью аутологичных трансплантатов и синтетических имплантатов, которые имеют ряд недостатков: тромбоз, воспаление, несоответствие механических свойств нативным тканям. Для компенсации недостатков этих двух групп материалов ведутся разработки тканеинженерных конструкций на основе синтетических полимеров, заселенных клетками сосудистой стенки.

Цель работы – создание заселенного клетками трубчатого тканевого эквивалента кровеносного сосуда. Эндотелиальные клетки получены из фрагментов кардиальной ткани крыс по ранее разработанному протоколу выделения эндотелиальных клеток человека из отходного послеоперационного материала кардиальных

эксплантов с модификациями. Полученные клетки демонстрировали позитивную окраску антителами к эндотелиальным маркерам RECA-1 и vWF, вырабатывали компоненты межклеточного матрикса.

В качестве материала для изготовления каркаса выбран биосовместимый полимер полиуретан с высокой механической прочностью и эластичностью, приближенной к нативному сосуду. Эндотелиальные клетки, заселенные на поверхность сформированного матрикса, демонстрировали сохранение функциональных маркеров. Формирование трубчатого каркаса осуществлялось методом электроспиннинга на цилиндрическую фильеру диаметром 1,2 мм. Образцы стерилизовали посредством гамма-излучения после предварительной инкубации в фосфатном буфере с антибиотиком, обрабатывали раствором компонентов внеклеточного матрикса.

Перед заселением конструкта эндотелиальные клетки окрашивали флуоресцентным митохондриальным красителем. Заселение проводилось в ротационном биореакторе. Анализ заселенных конструкций проводился методом иммунофлуоресцентного окрашивания с последующей конфокальной микроскопией трубчатой тканеинженерной конструкции. Подтверждено сохранение эндотелиального фенотипа и формирование монослоя эндотелиальных клеток на внутренней поверхности заселенной тканеинженерной конструкции.

Полученные тканеинженерные конструкции могут стать основой для разработки высокотехнологичного клеточного продукта для регенеративной медицины.

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ ПЛАЗМА-АКТИВИРОВАННОЙ СРЕДОЙ НА АКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА *IN VITRO*

Захарченко А.Е.[1*], Калинин Е.В.[1], Домнин П.А.[1,2], Акишев Ю.С.[1,3], Ермолаева С.А.[1,2]

1. *ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия*
2. *ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия*
3. *АО «ГНЦ РФ Троицкий институт инновационных и термоядерных исследований», Троицк, Россия*

E-mail: zakharchenko_a_e@mail.ru*

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) все чаще упоминаются как потенциальный инструмент регенеративной медицины. Известно, что некоторые воздействия физической природы оказывают эффект на свойства и статус МСК. Одним из рассматриваемых способов воздействия является обработка низкотемпературной плазмой (НТП), представляющей из себя ионизированный газ, а также плазма-активированной средой (ПАС), т.е. питательной средой, подвергнутой обработке НТП. Эффект вышеуказанных факторов на биологические системы основывается на действии активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА).

В данной работе изучаются ранние изменения внутриклеточного окислительно-восстановительного статуса МСК при обработке ПАС.

Использованный источник НТП был описан ранее. ПАС представляла собой среду αMEM, подвергнутую обработке аргоновой НТП в течение 1 минуты. МСК 3-го пассажа, полученные из костного мозга крысы линии Wistar, засевались на 96-луночные культуральные планшеты, в которых производились измерения мембранного потенциала митохондрий, содержания внутриклеточных АФК и синглетного кислорода путем флуориметрического окрашивания. В отмытые лунки с клетками

заливалась ПАС, проводилась инкубация в течение 1 минуты, производились отмывка и замена свежей культуральной средой. Измерения вышеуказанных показателей производились через 0, 15, 120 и 240 минут после обработки.

Через 240 минут после инкубации наблюдался скачок значений содержания внутриклеточных АФК и синглетного кислорода в 2,2 раза, а мембранного потенциала митохондрий в 2 раза относительно нулевой точки. При этом в точках 15 минут наблюдалось изменение показателей до 0,20, 0,86 и 1,16 относительно исходных, соответственно, а через 120 минут до 0,20, 0,65 и 0,92, соответственно. Таким образом, после обработки ПАС наблюдалось снижение содержания внутриклеточных АФК и синглетного кислорода при последующем скачке через 240 минут. По активности митохондрий наблюдалось небольшое увеличение значения с последующим падением и аналогичным скачком через 240 минут.

Таким образом, речь идет о наблюдении отложенного во времени эффекта от обработки ПАС на МСК, заключающегося в индукции экзогенными АФК, окислительного стресса, активации систем антиоксидантной защиты в клетке, последующему падению уровня внутриклеточных АФК ниже приемлемых, индукции активности митохондрий и генерации внутриклеточных АФК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №24-45-20006).

ОЦЕНКА ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ БЕЛКОВОГО СОСТАВА СЕКРЕТОМА ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЛИНИИ DFFh

Иванова А.А.[1*], Хотин М.Г.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: anastasiaivanova131@gmail.com*

Перспективность применения клеточного секретома в составе лекарственных препаратов ограничена вариабельностью его состава, что определяет необходимость выявления влияющих на это факторов и разработки подходов к стандартизации.

Для управления составом секретома первично требуется определить уровень его биологической вариабельности, которая не зависит от условий культивирования, возраста культуры и методики выделения. Для решения этой задачи мы многократно в одинаковых условиях собирали кондиционированную среду клеток линии DFFh (коллекция клеток биомедицинского назначения РКТКК, ИНЦ РАН) на 9 пассаже после 96 часов депривации FBS. Белковый компонент кондиционированной среды выделяли путем концентрирования через фильтры 10 кДа (Millipore). Таким образом получали секретом, содержащий в том числе и экзосомы, и везикулы.

Оценивали качественные и количественные характеристики. Так, установлено, что количество в перерасчете на 10^6 клеток составляло 427±56 мкг тотального белка.

Проведен независимый протеомный анализ методом нано-LC–MS/MS. После фильтрации по числу пептидов выявлено 2066 различных белков. Затем были сформированы следующие группы: воспроизводимое ядро из 1502 белков (общие для всех выделений с коэффициентом вариации ≤30%); общие для всех выделений, но отличающиеся по количеству – 366 белков; вариабельная часть (белки, выявленные только в части выделений) – 198 белков. Таким образом, вариабельность состава секретома клеток линии DFFh достигает 27%.

Для кластеризации белков по функциональным группам использована база UniProt.

Выявлено, что в воспроизводимой и вариабельной частях секретома присутствуют группы белков, относящихся к классическим внеклеточным (ВКМ, экзосомальные, секретируемые) и внутриклеточным (цитоскелет, белки внутриклеточных компартментов, др). Их появление в составе кондиционированной среды может быть обусловлено повреждением или гибелью части клеток как естественной, так и под действием длительной депривации FBS. При этом в стабильном ядре секретома больше по набору и количеству классических внеклеточных белков, а в вариабельной группе внутриклеточных белков.

В результате проведенных исследований показана биологическая вариабельность секретома DFFh, что критически важно для разработки подходов к его стандартизации.

ОСТЕОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СТРОНЦИЙ-ЗАМЕЩЕННОГО ФОСФАТА КАЛЬЦИЯ В КУЛЬТУРЕ ПАЦИЕНТ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МСК: РОЛЬ МИКРООКРУЖЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОСТЕОПОРОЗА

Канищев П.А.[1*], Дарвиш Д.М.[1], Неганова И.Э.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: pavelkan-20@mail.ru*

Остеопороз (ОП) – сложное полигенное метаболическое заболевание скелета, характеризующееся снижением плотности костной ткани (КТ) и усилением ее хрупкости. Синтетические материалы на основе фосфата кальция, аналога минерального компонента КТ, используются для восстановления поврежденной кости. Стронций-замещённые три кальций-фосфатные (Sr-ТКФ) цементы являются распространенной формой синтетического материала. Благодаря сходству с Ca^{2+}, Sr^{2+} проявляет остеогенные

свойства, аналогичные свойствам Ca^{2+}, повышающим уровень мастер-регулятора остеогенеза – транскрипционного фактора *RUNX2*. Это предполагает, что материалы на основе Sr-ТКФ перспективны для целей регенеративной медицины благодаря своим про-остеогенным свойствам.

Целью работы была оценка про-остеогенных свойств Sr-ТКФ на пациент-специфических клеточных линиях (ПСКЛ), полученных от пациентов с остеопорозом.

ПСКЛ культивировали в ростовой среде (РС) с добавлением суспензии Sr-ТКФ. Контролем служили ПСКЛ в РС без добавления препарата. Токсичность материала и его влияние на пролиферативные свойства оценивали методом окрашивания LIVE/DEAD на 7 сутки культивирования в РС с добавлением препарата. Про-остеогенные свойства материала оценивали методом qPCR в реальном времени на 7 сутки культивирования в остеогенных (ОД) условиях. Окрашивание ализариновым красным S проводили на 21 день ОД для выявления стимулирующего эффекта препарата на образование и минерализацию внеклеточного матрикса.

Подсчет клеток на 7 сутки в РС показал, что в опытных образцах с добавлением различных концентраций (1,25/2,5/5,0 мг/мл) суспензии материала пролиферация клеток была выше, чем в контроле. Окрашивание методом LIVE/DEAD выявило, что число живых клеток в опытных образцах превышает число живых клеток в контроле, что предполагает, что Sr-ТКФ в данном диапазоне концентраций не цитотоксичен и поддерживает пролиферацию клеток. Окрашивание ализариновым красным S показало, что уровень минерализации внеклеточного матрикса в среде с содержанием 0,5 мг/мл препарата выше контроля, в остальных точках сопоставим с контролем, причем наблюдается дозозависимое падение интенсивности окрашивания.

В РС Sr-ТКФ не оказывает цитотоксического действия. Дальнейшее подтверждение про-остеогенных свойств препарата сделает данный

материал перспективным для создания новых композитов для использования в целях регенеративной медицины.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26–15-00216).

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ TGF-β, NOTCH И ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RUNX2

Караман И.А.[1*], Смирнова Д.В.[2], Малашичева А.Б.[2]

1. *ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: i.a.karaman@mail.ru*

Фиброз – это патологическое состояние, характеризующееся чрезмерным разрастанием соединительной ткани и накоплением внеклеточного матрикса. Особое место в регуляции фиброза занимают сигнальные пути Notch и TGF-β, кроме того, оказывающие значимое влияние на процесс остеогенной дифференцировки. Связь между двумя сигнальными каскадами остается малоизученной. Участие обоих путей в регуляции остеогенной дифференцировки открывает третьего игрока – транскрипционный фактор Runx2. Некоторые исследования последних лет указывают, что именно Runx2 является связующим звеном между TGF-β и Notch, однако молекулярные механизмы данного взаимодействия остаются недостаточно изученными.

Для оценки данного взаимодействия использовалась модель остеогенной дифференцировки *in vitro* первичных остеобластов человека. Модуляция экспрессии компонентов сигнальных путей проводилась с помощью лентивирусных конструкций, несущих кодирующие последовательности генов и короткие шпилечные РНК

(shNotch1, shRunx2, shCSL), TGF-β и двух видов ингибиторов: SB431542 (ингибитор TGF-β) и CADD522 (ингибитор Runx2). Влияние модификаций на остеобласты оценивалось с помощью метода ПЦР-РВ.

Совместное добавление TGF-β и активация сигнального пути Notch введением внутриклеточного домена NICD показывает значимое повышение экспрессии генов: *HEY1* - эффектор сигнального пути Notch, *COL1A1* и *ACTA2* - ключевые маркеры фиброза. При добавлении TGF-β также увеличивается экспрессия *RUNX2*, а активация Notch внутриклеточными доменом Notch1 и их совместное действие с TGF-β не оказывает значимого влияния на уровень *RUNX2*. Подавление сигнального пути Notch конструкцией shNotch1 приводит к уменьшению уровня *RUNX2* и компонента сигнального пути TGF-β - *SMAD3*; внесение конструкции, подавляющей экспрессию *CSL* - регулятора транскрипции, который связывается с внутриклеточным доменом NICD, приводит к снижению уровня экспрессии *RUNX2*, *COL1A1* и *ACTA2, SMAD2* и *SMAD3*.

Таким образом, совместное действие TGF-β и активации Notch приводит к синергичной активации эффекторов сигнального пути Notch, а также генов-маркеров фиброза. Наблюдаются перекрестные взаимодействия всех трех ключевых игроков иерархии: TGF-β, Notch и Runx2. На их связь и взаиморегуляцию указывает снижение экспрессии компонентов обоих сигнальных путей и самого *RUNX2* при введении конструкции, инактивирующей Notch.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-15-00280).

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ОРИЕНТИРОВАННЫХ КОЛЛАГЕНОВЫХ СТРУКТУР ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Каширина П.И.[1*], Марков Д.П.[2], Нащекин А.В.[2], Нащекина Ю.А.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: appolinaria.2004.ru@gmail.com*

Роговица — прозрачная оболочка глаза, её оптические свойства определяются организацией коллагеновых фибрилл в строме, которая составляет около 90% толщины и образована параллельными коллагеновыми пластинками — ламелями. Нарушение структуры вызывает помутнение роговицы и снижение зрения, а дефицит донорского материала требует разработки альтернативных подходов.

Цель работы — изучение ориентации молекул коллагена in vitro под действием электрического поля для формирования структур, аналогичных нативным ламелям стромы.

В работе использован коллаген I типа, выделенный из сухожилий крысиных хвостов. Для удаления телопептидов, стимулирующих спонтанное фибриллообразование, проводили ферментативную обработку пепсином при pH 1,6–1,9 с последующим диализом против воды до pH 5,5. Это выбрано для подавления как электростатического отталкивания молекул, так и неконтролируемой агрегации. Для визуализации коллаген метили флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 NHS ester. Ориентацию коллагеновых молекул осуществляли воздействием электрического тока. Варьирование времени воздействия (2, 4, 8 и 12 минут) позволило оценить кинетику формирования упорядоченных структур.

Образцы исследовали методами поляризационной, флуоресцентной, сканирующей электронной и конфокальной микроскопии. В поляризационном микроскопе ориентированные бандлы демонстрируют двулучепреломление. СЭМ показала хаотичную сеть фибрилл в контроле и формирование параллельных волокон при увеличении времени ориентации. На конфокальных изображениях меченый коллаген светится зелёным: при 2 минутах структура выражена слабо, при 8–12 минутах формируются плотные ориентированные волокна.

На следующем этапе оценивали влияние ориентации коллагена на морфологию клеток. Фибробласты культивировали сутки, фиксировали 4% формалином, обрабатывали 0,1% Triton X-100 и окрашивали DAPI и родамин-фаллоидином. На неориентированном коллагене клетки распределены хаотично, на ориентированном — вытягиваются вдоль волокон.

Таким образом, электрическое поле обеспечивает формирование упорядоченных коллагеновых структур. Минимальное время для ориентации — 2 минуты, оптимальная упорядоченность достигается при 8–12 минутах. Сформированные структуры направляют параллельную ориентацию клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-74-20120).

РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ МОДЕЛИ ЭНДОГЕННОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Кригер Д.В.[1*], Цимоха А.С.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: dkriger@incras.ru*

Поддержание протеостаза играет важную роль в сохранении клеточной идентичности, тогда как его перестройка является необходимым условием приобретения плюрипотентности в ходе репрограммирования соматических клеток. Ранее нами было показано, что в ходе репрограммирования наблюдается временное повышение экспрессии иммунопротеасом (ИП). Однако интерпретация этих результатов затруднена, поскольку для доставки факторов репрограммирования традиционно используют лентивирусные векторы, а вирусная трансдукция сама по себе сопровождается активацией врождённого иммунного ответа и индукцией ИП. Для исключения влияния этого фактора и однозначной оценки роли ИП нами был выбран подход эндогенного репрограммирования, основанный на создании клеточных линий с интегрированной в геном доксициклин-индуцируемой кассетой факторов Яманаки (Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc, OKSM). Для этого предполагается получение генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток мыши с интеграцией кассеты OKSM в локус Rosa26. После верификации линии будут дифференцированы в нейрональные стволовые клетки и использованы для последующего репрограммирования.

В качестве основы была выбрана система Tet-On 3G, отличающаяся высокой чувствительностью к доксициклину и минимальным уровнем фоновой экспрессии. Дополнительным преимуществом являлась архитектура all-in-one, объединяющая в одной конструкции ген трансактиватора rtTA и индуцибельную кассету, что должно было существенно упростить получение стабильных

клеточных линий. Полученная конструкция была успешно интегрирована в локус Rosa26 с использованием технологии CRISPR/Cas9. Однако в полученных линиях индуцируемая экспрессия трансгенов отсутствовала, по всей видимости, из-за недостаточного уровня экспрессии rtTA вследствие взаимного влияния промоторов hPGK и TRE3GS. Для устранения выявленных ограничений разработаны два новых варианта конструкций. Первый представляет собой модифицированную all-in-one архитектуру с переносом последовательности rtTA за индуцибельную кассету, что увеличивает расстояние между промоторами при сохранении интеграции всей конструкции в один аллель. Второй предусматривает создание двух независимых донорных конструкций для раздельной интеграции rtTA и индуцибельной кассеты OKSM в разные аллели локуса. Реализация предложенных подходов позволит создать модель эндогенного репрограммирования для исследования роли ИП без влияния вирусной трансдукции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-75-00174).

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ПЛАЦЕНТЫ ЯВЛЯЮТСЯ ПЕРСПЕКТИВНОЙ МОДЕЛЬЮ ДЕЦИДУАЛИЗАЦИИ СТРОМЫ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

Кунеев И.К.[1*], Петрова В.В.[1,2], Поникарова А.Н.[1,2], Шорохова М.А.[1], Башина А.В.[3], Домнина А.П.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*
3. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: kuneev.ik@incras.ru*

Изучение молекулярных механизмов функционирования женской репродуктивной системы человека сопряжено с серьезными этическими ограничениями и дефицитом релевантных животных моделей. Это существенно усложняет исследование децидуализации — ключевого процесса перестройки стромы эндометрия, необходимого для успешной имплантации эмбриона. В связи с этим актуален поиск источников клеток, способных к децидуальной дифференцировке (ДД) in vitro.

В работе использовали мезенхимные стромальные клетки (МСК), выделенные из плаценты человека, и стромальные клетки эндометрия (эСК) из его десквамированных фрагментов, содержащихся в менструальной крови. Оценку уровней экспрессии генов проводили методом ПЦР в реальном времени.

Ранее мы показали, что при индукции ДД в МСК различного происхождения экспрессия ее маркерных генов зависит от тканевого происхождения. МСК из тканей эндометрия и плаценты реагируют на добавление дибутирил-цАМФ значительным повышением экспрессии обоих маркерных генов ДД, PRL (пролактина) и IGFBP1 (инсулиноподобный фактор роста связывающего белка-1). В МСК из жировой ткани и пульпы зуба, в свою очередь, экспрессия PRL увеличивается несущественно, а IGFBP1 - вовсе не возрастает.

Также нами подтверждено, что МСК плаценты обладают иммунофенотипом и морфологией, аналогичными эСК.

Обнаружено, что МСК плаценты, в отличие от клеток эндометрия, имеют стабильно высокий уровень mRNA генов основных рецепторов к эстрогенам (ESR1) и прогестерону (PGR) на протяжении большего числа пассажей. ПЦР-РВ анализ также выявил у этих клеток высокий уровень экспрессии транскрипционного фактора FOXO1 — ключевого регулятора децидуализации. Кроме того, при гормональной стимуляции длительно культивированных МСК плаценты с помощью эстрадиола и медроксипрогестерона ацетата наблюдается повышение экспрессии генов FOXO1, HAND2 и одного из главных маркеров рецептивности, GPX3 (глутатионпероксидазы 3).

Таким образом, МСК из плаценты человека в культуре способны сохранять гормональную чувствительность и экспрессию важных в контексте децидуализации генов при пассировании. Полученные данные позволяют рассматривать МСК плаценты как сравнительно доступную и перспективную клеточную модель стромы эндометрия человека для масштабируемых исследований механизмов формирования рецептивности и патологий женской репродуктивной системы.

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА СЕНЕСЦЕНТНЫХ МСК НА ПАРАКРИННУЮ АКТИВНОСТЬ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ

Матвеева Д.К.[1*], Ездакова М.И.[1], Ратушный А.Ю.[1]

1. *ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

E-mail: matveeva.dajana@yandex.ru*

Старение организма сопровождается накоплением сенесцентных клеток в тканях, что ведет к дисфункции микроокружения. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются ключевым компонентом периваскулярной ниши, а их внеклеточный матрикс (ВКМ) выполняет не только структурную, но и регуляторную функцию, влияя на ангиогенез и гомеостаз. Цель работы — охарактеризовать изменения ВКМ сенесцентных МСК и оценить его воздействие на паракринный профиль эндотелиальных клеток (*ЭК) in vitro*.

Исследование выполнено на первичных культурах МСК и ЭК человека. Для моделирования клеточного стресс-индуцированного старения МСК обрабатывали митомицином С (1,5 мкг/мл, 18 ч). Для изучения ВКМ использовали метод децеллюляризации с последующим масс-спектрометрическим анализом белкового состава. Паракринный потенциал ЭК оценивали с помощью мультиплексного анализа.

Установлено, что старение МСК сопровождалось выраженным дисбалансом в продукции компонентов ВКМ: выявлено снижение экспрессии структурного *COL1A1* и повышение протеаз *MMP1* и *PLAU*. Протеомный анализ выявил достоверное снижение содержания структурных белков: коллагена I типа, фибулинов (4 и 5), перлекана, нидогена и фермента LOXL1, что в тканях может отражаться на нарушении эластичности и целостности базальной мембраны. Одновременно наблюдалось накопление молекул, ассоциированных с фиброзным патогенезом тканей, таких как PAI-1 и GDF-15, а также коллагена VIII типа, содержащий домен

антиангиогенного матрикина. При культивировании ЭК на дцВКМ от молодых МСК отмечалась стимуляция секреции проангиогенных факторов (FGF-2, PDGF, HGF) и хемокинов (SDF-1, G-CSF). В отличие от этого, ВКМ сенесцентных МСК приводил к частичной дисфункции паракринной активности ЭК. Хотя продукция FGF-2 и PDGF сохранялась на уровне молодого ВКМ, наблюдалось достоверное (более чем в 2 раза) снижение секреции цитокинов с проангиогенной и хемоаттрактивной активностью, таких как SDF-1, HGF, G-CSF. Уровни провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, GRO-a) значимо не различались между группами.

Полученные данные свидетельствуют о том, что изменения в составе ВКМ при старении ниши приводят к ослаблению сигнализации ЭК. Результаты работы могут послужить основой для разработки антисенесцентных стратегий, направленных на восстановление состава ВКМ и нормализацию взаимодействий в периваскулярной нише.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-75-10030).

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ БИОЧЕРНИЛ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА И МЕТАКРИЛИРОВАННОГО ЖЕЛАТИНА ДЛЯ ПОРТАТИВНОЙ ЭКТРУЗИОННОЙ БИОПЕЧАТИ

Михайлюк Н.М.[1*], Сенковенко А.М.[1], Норахан М.Х.[1], Бикмулина П.Ю.[1], Тимашев П.С.[1]

1. *ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова», Москва, Россия*

E-mail: mikhailyuk.nm@gmail.com*

В настоящее время биопечать тканеинженерных конструктов является одним из основных методов, используемых для создания биоэквивалентов тканей (Ansari S. et al, 2021). Перспективным

является использование в качестве материалов для биочернил альгината и метакрилированного желатина (Alg-GelMa), сочетающих высокую биосовместимость и настраиваемые механические свойства, что необходимо для формирования сложных трехмерных структур (Sanchez-Rubio A. et al, 2025).

Таким образом, целью данной работы является разработка системы биочернил для портативного экструзионного биопринтера, и стандартизация протоколов биопечати, для создания с помощью него тканеинженерных конструкций.

В рамках работы была разработана гидрогелевая система на основе альгината и GelMa. В процессе печати растворы альгината в фосфатно-солевом буфере и GelMa в растворе $CaCl_2$ смешиваются, и происходит ионная сшивка альгината. Затем напечатанные конструкции укрепляются ковалентной сшивкой GelMa при помощи УФ-излучения с длиной волны 405 нм. Свойства гидрогелевой системы исследовались на композициях с концентрацией альгината 1% и 2% в сочетании с GelMA 5% и 10%. Реологические тесты показали, что у всех композиций уменьшается вязкость при увеличении скорости сдвига, а предел их текучести находится на уровне 15% сдвиговой деформации, что делает их оптимальными для биопечати с клеточным компонентом. Гидрогелевые матриксы продемонстрировали жесткость от 4 до 9 кПа, что соответствует жесткости нативных тканей. Для оценки жизнеспособности были проведены *in vitro* и *in vivo* тесты культивирования клеточных сфероидов из мезенхимальных стромальных клеток в указанных гидрогелях. Все композиции показали оптимальную клеточную выживаемость (80%). Тесты биопечати проводились с использованием портативного экструзионного биопринтера, наибольшую точность печати и сохранение формы (80% относительно формы печати) показали биочернила с соотношением Alg-GelMa 1:10. Наличие в композиции 10% GelMa способствовало стабильной постепенной биодеградации.

Разработанные на основе Alg-GelMa биочернила продемонстрировали оптимальные физико-механические и

структурные свойства. Клеточные тесты показали высокую жизнеспособность и функциональную активность клеточных сфероидов. Напечатанные конструкции продемонстрировали высокую структурную стабильность и постепенную биодеградацию.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2026-308).

РЕГУЛЯЦИЯ БИОДОСТУПНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО NAD В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ

Московская Ю.П.[1*], Кропотов А.В.[1], Куликова В.А.[1], Никифоров А.А[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: jumoscowskaya@gmail.com*

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) является универсальным коферментом, принимающим участие в метаболических и сигнальных процессах, которые в клетках эукариот компартментализованы. Несколько семейств NAD-зависимых регуляторных белков, включая сиртуины и поли(ADP-рибозил)полимеразы, задействованы в сигнальной трансдукции и контролируют важнейшие клеточные процессы, в частности, критичные для раннего эмбриогенеза. До 70% клеточного NAD содержится в митохондриях, тогда как его биодоступность в данном компартменте может регулироваться за счет синтеза из никотинамидмононуклеотида ферментом NMNAT3 или импорта из цитозоля белком-переносчиком SLC25A51. Данная работа посвящена изучению механизмов поддержания митохондриального пула NAD, а также его роли в регуляции плюрипотентности и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши (мЕСК) E14. Нами были созданы клеточные модели с усиленной и

подавленной экспрессией белков Nmnat3 и Slc25a51. Для оценки митохондриального NAD использовали репортерную линию E14, экспрессирующую каталитический домен PARP1, синтезирующий полимеры ADP-рибозы пропорционально уровню NAD в митохондрии. На модели поддержания плюрипотентного состояния мЭСК E14 в присутствии лейкемия ингибирующего фактора и запуска дифференцировки заменой его на ретиноевую кислоту мы установили, что при дифференцировке клеток уровень внутриклеточного NAD остается неизменным, однако происходит его накопление в матриксе митохондрий. Кроме того, мы показали, что модуляция экспрессии Nmnat3 не оказывает влияния на митохондриальный и внутриклеточный пулы NAD в целом, а также не влияет на жизнеспособность и плюрипотентные свойства мЭСК E14. При этом после обработки клеток предшественником динуклеотида NRH сверхэкспрессия Nmnat3 в митохондрии приводила к значительному увеличению уровня внутриклеточного NAD, однако митохондриальный пул при этом оставался неизменным. Результаты свидетельствуют о том, что при дифференцировке мЭСК E14 происходит перераспределение NAD между цитозолем и митохондрией, тогда как поддержание митохондриального пула NAD не связано с активностью белка Nmnat3. Таким образом, вероятно основным механизмом поддержания митохондриального пула NAD в клетках E14 является его импорт из цитозоля переносчиком Slc25a51.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-14-00502).

ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРМОВАННЫХ МАТРИКСОВ ИЗ ПОЛИЛАКТИДА С ОРИЕНТИРОВАННЫМИ ВОЛОКНАМИ В МОДЕЛИ РЕГЕНЕРАЦИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Пермякова А.А.[1,3,5*], Пирязев А.А.[1,4], Иванов Д.А.[1,4], Монахова К.З.[2], Багров Д.В.[1,3], Клинов Д.В.[3]

1. *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
2. *Институт синтетических полимерных материалов имени Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия*
3. *ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия*
4. *Научно-технический университет Сириус, Сочи, Россия*
5. *Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*

E-mail: dex.winner@gmail.com*

Электроспиннинг – это метод получения нетканых матриксов из ультратонких волокон (до 1 мкм), которые по своей морфологии воспроизводят структуру естественного внеклеточного матрикса. Особый интерес представляет получение биосовместимых матриксов с ориентированными волокнами для обеспечения направленного роста клеток в задачах регенеративной медицины, включая регенерацию мышечной ткани. Вытягивание матриксов из полилактида (ПЛА) в этиловом спирте позволяет получать ориентированные волокна. Но оставалась неясной роль остаточного растворителя, который может влиять на механические и биологические свойства матрикса.

Целью работы стало получение электроформованных матриксов из ПЛА и оценка влияния остаточного растворителя на их биосовместимость в модели *in vitro* на культуре миобластов, а также

оценка биосовместимости полученных матриксов *in vivo* при имплантации матриксов в мышцы конечностей мышей.

Матриксы были изготовлены из раствора ПЛА в гексафторизопропаноле (ГФИП). Часть матриксов подвергли вакуумной сушке для удаления растворителя. Свежие и высушенные матриксы растягивали в этаноле с построением зависимости напряжения от деформации. Количество остаточного растворителя оценивали с помощью термогравиметрического (ТГА) и элементного анализа. Все образцы дополнительно охарактеризованы с помощью сканирующего электронного микроскопа.

Показано, что в свежих матриксах остается 2,8-4,2% растворителя. После сушки его количество снижалось до 0,8%. Степень вытяжения матриксов зависит от количества остаточного ГФИП: свежие вытягиваются до 350-400%, высушенные – рвутся при вытяжении до 300%. Вне зависимости от количества остаточного растворителя вытяжка матрикса из ПЛА в спирте приводила к интенсивному выравниванию волокон.

Для оценки биосовместимости мышиные миобласты С2С12 культивировали на матриксах в течение 5 дней и оценивали морфологию и выживаемость клеток. На первые сутки клетки показали ярко выраженную тенденцию к вытягиванию вдоль направления волокон на анизотропном субстрате. К концу периода культивирования клетки сформировали монослой на обоих субстратах. Показано, что остаточный растворитель в матриксах угнетает рост клеток. В связи с этим оптимизирована процедура изготовления и подготовки ориентированных матриксов для экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

Дополнительно ориентированные высушенные матриксы имплантировали мышам в икроножные мышцы. Получены гистологические данные о поведении матриксов в тканях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-15-00246).

ВВЕДЕНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА В ТРЕХМЕРНУЮ КУЛЬТУРУ МСК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА СНИЖАЕТ ИХ ПРОАНГИОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ

Петрова В.В.[1, 2*], Поникарова А.Н[1, 2], Кунеев И.К.[1], Башина А.В.[3], Домнина А.П.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*
3. *Санкт-Петербургский аграрный университет, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: petrova.viktoria2022@gmail.com*

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) находят широкое применение в качестве in vitro моделей для фундаментальных исследований и являются перспективным объектом в регенеративной медицине. 3D культивирование дает возможность воссоздания тканевой архитектуры и усиливает терапевтический потенциал МСК за счет увеличения их паракринной активности. In vivo МСК локализуются в периваскулярном пространстве, поэтому добавление эндотелиального компонента в культуру МСК помогает более точно воспроизвести их нативное микроокружение.

Цель данной работы - оценить влияние эндотелиальных клеток на экспрессию генов, ассоциированных с ангиогенезом, в МСК. Для этого из МСК эндометрия и клеток эндотелия пупочной вены (HUVEC) в соотношении 1:2 формировали гетеротипические сфероиды методом висячей капли и культивировали в течение 72 часов. Полученные совместные культуры разбивали до единичных клеток и подвергали сортингу. Сортированные клетки осаждали центрифугированием и выделяли тотальную РНК. Контролем служили МСК эндометрия из гомотипических сфероидов.

Изменения уровней экспрессии генов оценивались методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Было обнаружено снижение уровня экспрессии фактора роста эндотелия (VEGF) сосудов в МСК эндометрия, культивированных вместе с HUVEC, при одновременном повышении уровней экспрессии обоих основных типов рецепторов к нему (VEGFR1/2). Кроме того, наблюдалось снижение уровня экспрессии гена фактора некроза опухоли альфа белка 6 (TNFAIP6). Отмеченные изменения могут быть обусловлены индуктивным взаимодействием клеток и перестройкой паракринной коммуникации между МСК и эндотелием. Обнаруженное повышение уровней экспрессии VEGFR1 и VEGFR2 указывает на активацию сигнальных путей, регулирующих пролиферацию, рост и выживание клеток. Снижение уровня экспрессии TNFAIP6 свидетельствует об ослаблении противовоспалительной активности, возникающей при переводе МСК в трехмерную культуру.

Таким образом, введение эндотелиального компонента может компенсировать противовоспалительную и проангиогенную активность МСК, возникающую при переходе к 3D культивированию. Это открывает новые возможности управления фенотипом при биомедицинском применении МСК и их продуктов, а также при создании моделей на их основе.

СФЕРОИДЫ И АЛЬГИНАТНЫЕ МИКРОГЕЛИ КАК МОДЕЛИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ БИОМЕДИЦИНЫ: СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ И АНАЛИЗ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК CT26

Плешаков П.С.[1,2*], Шмаков С.В.[1], Сосновицкая З.Ф.[1,2], Букатин А.С.[1,2,3]

1. *ФГБУ ВО и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж.И. Алфёрова РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ООО «ФЛИКСБИО»*
3. *ФГБУН «Институт аналитического приборостроения РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: avekipp@gmail.com*

Развитие технологий создания трёхмерных клеточных культур (3D культуры) является актуальной задачей, поскольку 3D клеточные модели более релевантно описывают поведение клеток внутри организма. К таким клеточным моделям относят сфероиды, представляющие собой плотно соединенное друг с другом скопление клеток, и микрогели, в которых клетки помещены внутрь гидрогелевых микрочастиц, имитирующих внеклеточный матрикс. Наибольший интерес представляют миниатюрные, до 500 мкм, модели, которые лучше поддаются стандартизации, необходимой для тестирования лекарств, а также могут использоваться в инъекционной форме для восстановления повреждённых тканей.

Для формирования клеточных сфероидов и микрогелей было разработано множество методов, большинство из которых малопроизводительны и требуют ручного труда. Технологии капельной микрофлюидики сочетают в себе возможности автоматизации и контроля параметров получаемых микрогелей с клетками, такие как диаметр частиц, плотность и состав гидрогелей, тип и степень наполнения клетками, внутренняя структурированность.

В данной работе мы сравнили развитие клеток колоректального рака мыши CT26 в клеточных сфероидах до 1000 начальных клеток, сформированных методом висячей капли, с их развитием внутри альгинатных микрогелей, синтезированных в микрофлюидном устройстве. В образцах мы оценивали жизнеспособность клеток, клеточный цикл и степень некроза и апоптоза с помощью методов конфокальной микроскопии и проточной цитометрии. В обоих случая наблюдалась высокая жизнеспособность и активная пролиферация.

Таким образом, в работе проведено сравнение ручного и микрофлюидного метода создания 3D клеточных культур, а также расширено представление о поведении клеток CT 26, использующихся при разработке противоопухолевой иммунотерапии, в клеточных сфероидах и внутри альгинатных микрогелей. В будущем это поможет увеличить эффективность разработки новых лекарств, а также внести большой вклад в развитие технологий тканевой инженерии.

ИНАКТИВАЦИЯ ИММУНОПРОТЕАСОМЫ НЕ ВЛИЯЕТ НА ВОСПРИИМЧИВОСТЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ К РЕТРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Поденкова У.И.[1*], Цимоха А.С.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: uliana.podenkova@gmail.com*

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши служат ключевой моделью для изучения молекулярных механизмов раннего эмбриогенеза. Перестройка клеточной идентичности при переходе между состояниями плюрипотентности и при последующей дифференцировке требует тонкой регуляции протеома, которая во многом обеспечивается убиквитин-протеасомной системой. Наряду с конститутивной формой протеасомы существует ее

специализированная изоформа – иммунопротеасома (ИП). Она содержит индуцибельные каталитические субъединицы Lmp2, Lmp7, Mecl-1. Традиционно ИП связывают с адаптивным иммунитетом, однако в последнее время ее все чаще рассматривают как регулятор фундаментальных клеточных процессов, в том числе и в раннем эмбриогенезе.

Ранее мы показали активацию ИП при переходе ЭСК мыши из наивного в формативное плюрипотентное состояние (ЭпиПК). Известно, что одним из активаторов экспрессии ИП в клетке является транскрипционный фактор Irf1. Согласно литературным данным, Irf1 активируется при переходе ЭСК мыши в ЭпиПК, а при его отсутствии клетки становятся более восприимчивыми к вирусной инфекции. Наш анализ открытых данных РНК-секвенирования выявил снижение экспрессии субъединиц ИП в Irf1-дефицитных ЭпиПК мыши. Опираясь на эти результаты, а также на известную роль ИП в противовирусной защите соматических клеток, мы выдвинули гипотезу о вовлеченности ИП в механизмы защиты ЭСК от вирусного заражения.

Для проверки гипотезы оценивали эффективность трансдукции наивных ЭСК и ЭпиПК модельными ретровирусными частицами. ИП инактивировали с помощью селективного ингибитора PR-957 и нокаута гена *Psmb8*, кодирующего субъединицу ИП Lmp7. Эффективность трансдукции оценивали с помощью проточной цитометрии по уровню флуоресценции встроенного в вирусные конструкции белка EGFP. Статистически достоверных различий между контролем и клетками с инактивированной ИП обнаружено не было. Полученные данные указывают на отсутствие прямого вклада ИП в ограничение ретровирусной инфекции в ЭСК мыши, демонстрируя фундаментальное отличие стволовых клеток от соматических. Таким образом, несмотря на транскрипционную связь генов ИП с фактором Irf1, их активация в раннем эмбриогенезе, по-видимому, направлена не на противовирусный ответ, а на поддержание протеостаза и ремоделирование протеома в ходе дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №22-14-00390-П).

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ПЕРЕДНЕГО СЕГМЕНТА ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ СКРИНИНГА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ТЕРАПИИ ПАТОЛОГИЙ РОГОВИЦЫ И ХРУСТАЛИКА

Полянина А.О.[1,2*], Соловьёв Д.А.[1,3,4], Александер-Синклер Э.И.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*
3. *ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Минобороны РФ, Санкт-Петербург, Россия*
4. *ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: polyanina_00@bk.ru*

Заболевания переднего сегмента глаза человека остаются одной из ведущих причин нарушения зрения в мире. Разработка новых фармакологических подходов к их профилактике и лечению требует адекватных клеточных моделей для доклинической оценки эффективности и безопасности препаратов. Неиммортализованные культуры клеток - лимбальные стволовые клетки (LSC); кератоциты стромы роговицы (KSC) - обладают высокой физиологической релевантностью, но их использование ограничено трудоёмкостью получения. Иммортализованные линии - клетки эпителия роговицы (HCE) и конъюнктивы (CCL-20.2) - обеспечивают стандартизированные результаты, но могут не полностью отражать физиологию нативных тканей. В литературе малочисленны данные о сравнительной чувствительности этих клеточных типов к фармакологическим агентам в идентичных условиях. Целью исследования явилась разработка тест-систем на основе

неиммортализованных и иммортализованных культур клеток переднего сегмента глаза человека для доклинического скрининга фармакологических соединений, предложенных для профилактики вторичной катаракты и лечения кератитов.

Культуры LSC и KSC были получены из кадаверных роговиц человека, HCE и CCL-20.2 - из коллекций клеточных культур. На основе этих линий были созданы экспериментальные модельные тест-системы для первичного скрининга схем инстилляции веществ для профилактики вторичной катаракты и антисептика N для лечения кератитов. Жизнеспособность клеток оценивали по морфологии и метаболической активности (МТТ-тест).

Выявлено, что неиммортализованные и иммортализованные клетки демонстрируют различную чувствительность к исследуемым агентам. При скрининге веществ для профилактики вторичной катаракты наиболее чувствительными оказались неиммортализованные LSC, тогда как при тестировании антисептика N иммортализованные HCE и CCL-20.2 проявляли более выраженную чувствительность.

Разработанные тест-системы на основе неиммортализованных и иммортализованных культур клеток переднего сегмента глаза человека являются эффективным инструментом для первичного скрининга фармакологических соединений. Различная чувствительность клеточных типов подчёркивает необходимость использования как неиммортализованных, так и иммортализованных культур для комплексной оценки цитотоксичности. Созданные модели могут быть применены для дальнейшей разработки терапевтических подходов при патологиях переднего сегмента глаза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания № FMFU-2026-0012.

ПАРАЗИТАРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ КАК ИНСТРУМЕНТ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

Пономарев Д.В.[1]*, Ковнер А.В.[1], Запарина О.Г.[1], Пахарукова М.Ю.[1]

1. *ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия*

E-mail: idkdiam@gmail.com*

Хронические незаживающие раны при сахарном диабете остаются одной из наиболее серьёзных проблем современной регенеративной медицины. Поэтому поиск новых биологически активных молекул, способных стимулировать регенерацию эпидермиса в условиях гипергликемии, представляет особый интерес.

Паразитические черви (трематоды) выработали уникальные стратегии выживания в организме хозяина, в том числе модифицируя воспаление и процессы репарации посредством экскреторно-секреторных продуктов (ESP), насыщенных сигнальными белками и малыми некодирующими РНК. ESP можно рассматривать как природные библиотеки регуляторных факторов, эволюционно «заточенных» на тонкую настройку тканевых реакций.

Цель: оценить влияние ESP трематоды *Opisthorchis felineus* на заживление ран при диабете в условиях *in vivo* и *in vitro* и тем самым проверить, могут ли паразитарные секреторные молекулы выступать в роли регуляторов регенерации кожи.

В экспериментах *in vivo* мы использовали стрептозотоциновую модель диабета у мышей C57Bl/6 (n=28). После достижения устойчивой гипергликемии животным наносили стандартные кожные раны диаметром 5 мм и проводили местную терапию. Обработка ESP приводила к ускоренному заживлению ран, сопоставимому с группой терапии PDGF, при этом формирование эпителиальных валиков и восстановление эпидермиса свидетельствовало о более физиологичном характере регенерации без избыточной гиперплазии.

В экспериментах *in vitro* на линии человеческих кератиноцитов HaCaT моделировали условия диабета, что приводило к снижению пролиферации клеток. Добавление ESP трематоды восстанавливало пролиферативную активность. При этом скорость миграции клеток также возвращалась к значениям контрольной группы. Эти результаты свидетельствуют о нормализации ключевых параметров эпидермальной репарации.

Таким образом, высокая концентрация глюкозы нарушает базовые программы регенерации эпидермиса, подавляя пролиферацию и миграцию кератиноцитов *in vitro* и *in vivo*. На этом фоне биомолекулы трематоды *O. felineus* частично компенсируют эти нарушения и стимулируют заживление ран в условиях модели диабета. Это открывает перспективное направление для регенеративной биомедицины: функциональное тестирование отдельных биоактивных компонентов паразитарного секретома (сигнальных белков, экзосомальных РНК) может привести к созданию новых классов ранозаживляющих препаратов, основанных на естественных механизмах модификации тканевого микроокружения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №26-14-00167).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДРОЖЖЕВОЙ NADH-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ NDI1 НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Разумова А.А.[1]*, Старкова Т.Ю.[1], Горевич Г.И.[1], Скворцова Е.В.[1], Аксенов Н.Д.[1], Томилин А.Н.[1], Синенко С.А.[1]

1. ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: anna.razum28@gmail.com*

Плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) обладают неограниченным пролиферативным потенциалом и способностью к дифференцировке во все типы клеток взрослого организма. Пролиферативная активность данных клеток в культуральных условиях схожа с высокой скоростью деления иммортализованных и раковых клеток. Для ЭСК характерен определенный статус энергетического метаболизма, включающий как гибридный метаболизм (одновременную активацию окислительного фосфорилирования и гликолиза), так и полное переключение на гликолитический путь образования энергии – эффект Варбурга. Ранее нами было установлено, что инактивация гена *Ndufs1*, кодирующего основную субъединицу комплекса I электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), в ЭСК мыши приводит к метаболическим изменениям, повышенному образованию активных форм кислорода (АФК), увеличению соотношения NADH/NAD+ и выраженному угнетению пролиферации при сохранении признаков плюрипотентности. Снижение пролиферативной активности при дисфункции комплекса I было обнаружено также в иммортализованных трансформированных клетках человека HEK293T. С использованием бактериальной НАДН-дегидрогеназы LbNOX мы установили, что именно повышенное соотношение НАДН/НАД+ участвует в подавлении пролиферации мЭСК, нокаутных по *Ndufs1*. Настоящая работа направлена на установление роли АФК, стабилизации образования АТФ и в целом активности ЭТЦ в пролиферативной активности ЭСК мыши и HEK293T дикого

типа и с дефектами функционирования комплекса I с помощью эктопической экспрессии дрожжевой NADH-дегидрогеназы Ndi1. Ndi1 представляет собой альтернативную NADH-дегидрогеназу внутренней мембраны митохондрий, которая окисляет NADH, передавая электроны напрямую в пул убихинона без сопряженной транслокации протонов. Экспрессия Ndi1 позволяет восстановить электронный поток, стабилизировать генерацию АТФ и частично восстановить окисление NADH при дефекте комплекса I, компенсируя его функцию. Мы эктопически экспрессировали Ndi1 с помощью лентивирусной конструкции в клетках дикого типа и клетках, нокаутных по *Ndufs1,* затем проанализировали пролиферативную активность полученных клеточных линий. Интересно, что эктопическая экспрессия Ndi1 в контрольных клетках HEK293T приводит к значительному снижению их пролиферативной активности. Дальнейший наш анализ позволит установить, способна ли экзогенная экспрессия Ndi1 в клетках с нарушением функции комплекса I восстановить их пролиферативный потенциал.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-14-00126).

СРАВНЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Рудакова А.О.[1*], Дьячкова У.Д.[1], Степанова Д.В.[1], Коробкина И.О.[1], Басалова Н.А.[1], Ефименко А.Ю.[1], Григорьева О.А.[1]

1. *ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия*

E-mail: rudakovaao@my.msu.ru*

Перспективным направлением регенеративной медицины является разработка биологических лекарственных препаратов на основе фракции внеклеточных везикул (ВВ) секретома мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека, что обусловлено их высоким терапевтическим потенциалом. Качество получаемых препаратов напрямую зависит от условий культивирования МСК, ключевым из которых является питательная среда. Подбор эффективной и доступной питательной среды служит важнейшей задачей при разработке препарата, поэтому целью данной работы стало сравнение параметров, характеризующих ВВ МСК, которые культивировали в двух различных средах, путем оценки концентрации и размера секретируемых ВВ, а также их функциональной активности в *in vitro* моделях. Для этого МСК жировой ткани человека культивировали в специализированной для этого типа клеток среде AdvanceSTEM™ (Cytiva) или стандартной среде αMEM (Capricorn Scientific) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 2 нг/мл фактора роста фибробластов (bFGF). По отработанному протоколу получали кондиционированную МСК среду, из которой выделяли фракцию ВВ путем ультрафильтрации на фильтрах с размером пор 300 кДа. Концентрацию и размер частиц оценивали методом анализа траекторий наночастиц (NTA). Средний размер частиц и их концентрация не различались при культивировании МСК в указанных средах. Далее оценивали

функциональные свойства ВВ МСК, используя разработанные нами ранее модели специфической активности (Дьячкова и соавт., 2025, РРЛС). В модели TGFβ-1-индуцированной дифференцировки линии дермальных фибробластов человека в миофибробласты действие TGFβ-1 приводило к увеличению уровня альфа-гладкомышечного актина (αSMA), измеренного иммуноблотингом, тогда как ВВ МСК, культивированных в обоих типах сред, снижали уровень αSMA до значений отрицательного контроля. Во второй модели оценивали действие ВВ МСК на поляризацию М1-макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека. Оказалось, что ВВ МСК, полученные при культивировании в αMEM снижают экспрессию генов провоспалительных факторов IL-1, IL-6 и TNFα более выражено по сравнению с ВВ МСК, культивированных в AdvanceSTEM™. Таким образом, αMEM с добавлением bFGF не уступает по эффективности AdvanceSTEM™ по всем изученным показателям, поэтому может служить целесообразной и экономически более доступной альтернативой для производства биологического лекарственного препарата на основе ВВ МСК.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИКАПРОЛАКТОНОВЫХ СКАФФОЛДОВ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ОСТЕОЗАМЕЩАЮЩИХ ИМПЛАНТАТОВ

Румянцева Е.А.[1,2*], Дубиненко Г.Е.[3], Чижикова А.С.[4], Домбровская Ю.А.[1], Котов М.И.[1], Шестаков М.С.[4], Приходько Е.М.[1], Силин А.В.[1], Алексенский А.Е.[4], Твердохлебов С.И.[3], Енукашвили Н.И.[1,2]

1. *ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
3. *ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, Россия*
4. *ФГБУН Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия*

Email: n.enukashvily@incras.ru*

Создание биологического материала для замещения и/или восстановления поврежденного органа или ткани - актуальная задача трансляционных исследований. Главной целью создания трехмерных каркасов (скаффолдов) является не только предотвращение коллапса мягких тканей, но и стимулирование пролиферации и дифференцировки клеток. Визуализация адгезированных клеток *in vivo* является важным условием использования таких каркасов. Детонационные наноалмазы как контрастирующий агент для магнитно-резонансной томографии – потенциальное решение проблемы прижизненной визуализации.

Целью работы была оценка влияния скафолдов на основе поликапролактона, гидроксиапатита и меди на остеогенный потенциал стволовых клеток пульпы зуба, их адгезию и пролиферативную активность, оценить влияние детонационных наноалмазов на жизнеспособность этих клеток.

Стволовые клетки пульпы зуба (СКП) культивировали на твердых скаффолдах на основе поликапролактона (ПКЛ) и гидроксиапатита (ГА) в определенных соотношениях с различными покрытиями. Для оценки остеогенной дифференцировки скаффолды с адгезировавшими СКП переносили в остеоиндуктивную среду и оценивали количество кальций-фосфатных отложений. Цитотоксичность детонационных наноалмазов оценивали с помощью МТТ-теста. Адгезию и пролиферацию оценивали методом прижизненного окрашивания СКП с помощью LUCS® 13 и визуализировали методами световой и флуоресцентной микроскопии.

Показано, что скаффолды на основе ПКЛ обладали остеоиндуктивным действием. Наличие дополнительного ГА покрытия не вносило существенного вклада в этот эффект. Напыление меди приводило к усилению остеоиндуктивных свойств скаффолдов. СКП хорошо адгезировали на внутренней поверхности пор и внешней однородной поверхности скаффолдов на основе ПКЛ. Признаков цитотоксичности детонационных наноалмазов не выявлено в исследуемых концентрациях (10 мг/мл; 1 мг/мл; 1 мкг/мл; 1 нг/мл; 0,1 нг/мл).

Работа выполнена в рамках НИР 125061106974-4 Государственного Задания Минздрава России. Скаффолды изготавливались в ТПУ при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект «Наука» FSWW-2026–0052. Использованы образцы детонационного наноалмаза производства СКТБ «Технолог» (Санкт-Петербург, Россия), после дополнительной очистки и деагломерации сопряжённой с химической модификацией поверхности отжигом в атмосфере водорода либо на воздухе для получения устойчивых гидрозолей выполненные в ФТИ имени А.Ф. Иоффе (FFUG-2024-0019).

РАЗРАБОТКА КОМБИНИРОВАННОГО ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО ИМПЛАНТАТА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СУСТАВОВ

Ручко Е.С.[1*], Голубинская П.А.[1], Печерицына С.А.[1], Цыганова А.С.[1], Емец Е.В.[1,2], Ильина П.Н.[2,3], Кандрашина С.С.[4], Иноземцев В.А.[4], Сергунова В.А.[4], Еремеев А.В.[1]

1. *ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия*
2. *ФГБУ НИИ глазных болезней имени И.И. Краснова, Москва, Россия*
3. *Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия*
4. *НИИ общей реаниматологии имени В.А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия*

E-mail: ruchkoevgeny@yandex.ru*

Остеоартроз и хронические воспалительные заболевания суставов остаются одной из распространённых причин снижения качества жизни и инвалидизации пациентов (GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators, 2023). Существующие фармакологические методы терапии преимущественно направлены на уменьшение симптомов или восстановление локальных дефектов хряща, но не обеспечивают воздействия на воспалительно-дегенеративные процессы, лежащие в основе заболевания (Rodriguez-Merchan, 2023). Поэтому актуальна разработка клеточных технологий, сочетающих восстановление хрящевой ткани с регуляцией воспалительной микросреды сустава.
Клеточные продукты на основе хондроцитов активно применяются в регенеративной медицине, однако в условиях хронического воспаления их терапевтический потенциал может снижаться (Zhang et al., 2014). Для повышения эффективности клеточных продуктов был разработан комбинированный тканеинженерный имплантат, включающий клетки хондрогенного ряда, мезенхимальные

стромальные клетки (МСК) и М2-поляризованные макрофаги как иммуномодулирующие компоненты.

В работе были получены и охарактеризованы клеточные компоненты для формирования хрящевого имплантата: первичные хондроциты из биопсийного материала доноров, ИПСК-производные хондроцитоподобные клетки, включая гипоиммуногенные линии, МСК и М2-поляризованные макрофаги. На их основе были сформированы трёхмерные клеточные композиции различного состава и проведено сравнение функциональных свойств.

Конструкции были проанализированы по стабильности 3D-структур, жизнеспособности, пролиферативной активности, содержанию гликозаминогликанов, экспрессии хондрогенных, про- и противовоспалительных маркеров. Методами флуоресцентной и конфокальной микроскопии было исследовано распределение клеточных популяций внутри сфероидов. С помощью ИФА была оценена роль МСК и М2-поляризованных макрофагов в формировании противовоспалительных свойств композиции.

В результате была получена серия тканеинженерных имплантатов различного клеточного состава и определена композиция, сочетающая сохранение хондрогенного фенотипа с противовоспалительным действием. Полученные данные показали перспективность комбинированного клеточного подхода для создания тканеинженерного продукта, направленного на восстановление хрящевой ткани и коррекцию воспалительной микросреды сустава.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-15-00127).

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ВАНАДИЛ-ЗАМЕЩЕННОГО ГИДРОКСИАПАТИТА НА СВОЙСТВА БИОКЕРАМИКИ И ЕЁ ЦИТОСОВМЕСТИМОСТЬ С M-FetMSC

Рыжов А.П.[1*], Фадеева И.В[2]

1. *ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия*
2. *ФГБУН «Институт металлургии и материаловедения имени А.А. Байкова РАН», Москва, Россия*

E-mail: rtakerica@gmail.com*

Гидроксиапатит (ГА) является перспективной основой остеозамещающих материалов благодаря сходству с минеральной фазой кости и биосовместимости. Ионное модифицирование позволяет регулировать его физико-химические и биологические свойства. Ванадилсодержащий ГА представляет интерес для регенеративной медицины, однако его свойства могут зависеть от способа получения порошка и предварительной обработки материала перед клеточными испытаниями.

Целью работы являлась оценка влияния метода синтеза ванадил-замещенного ГА на свойства биокерамики и её цитосовместимость с клетками M-FetMSC. Образцы состава $Ca_{9,99}(VO)_{0,01}(PO_4)_6(OH)_2$ получали осаждением из водных растворов солей и твердофазным методом с применением механохимической активации (МХА). Порошки исследовали методами РФА, ИК-спектроскопии и РЭМ. Керамические образцы формовали прессованием в виде балочек и дисков и обжигали при 1200 °C. Оценивали линейную усадку, кажущуюся плотность и прочность при трехточечном изгибе. Цитосовместимость *in vitro* оценивали по морфологии и пролиферации клеток M-FetMSC при прямом контакте с материалом.

Способ получения существенно влиял на поведение материала при спекании и механические свойства керамики. Для образцов, полученных осаждением, линейная усадка при 1200 °C достигала

20,9%, тогда как для МХА-образцов составляла 16–17%. Прочность при изгибе керамики из МХА-порошка составляла 30,69 ± 3,4 МПа, что превышало значение для образца, полученного осаждением, — 12,08 МПа. Это указывает на преимущество твердофазного синтеза с применением МХА для формирования более прочной ванадилсодержащей биокерамики.

При прямом контакте с клетками важным фактором была предварительная обработка материала. После двукратной промывки VO-ГА питательной средой клетки M-FetMSC активно прикреплялись, пролиферировали и формировали монослой к 9-м суткам. Таким образом, перспективность ванадил-замещенного ГА как материала для регенеративной медицины определяется не только составом, но и способом получения, микроструктурой, механическими характеристиками и подготовкой перед клеточным тестированием. С учетом комплекса материаловедческих характеристик наиболее перспективным для дальнейших исследований является VO-ГА, полученный твердофазным методом с применением МХА, при условии предварительной двукратной промывки перед *in vitro*-испытаниями.

СОЗДАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ 3D-СИСТЕМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ОСТЕОБЛАСТОВ

Бабаковская А[1*], Сердюкова Д.А.[1], Зиновьева А.С.[1], Малашичева А.Б.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: alena.babakovskaya@gmail.com*

Большинство исследований по изучению остеогенной дифференцировки выполнено на двумерных (2D) моделях, однако условия культивирования оказывают существенное влияние на ход дифференцировки и минерализацию матрикса. В отличие от

монослойной культуры трехмерные (3D) сфероиды в большей степени воспроизводят межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия, пространственную организацию ткани и особенности микроокружения, что делает их более релевантной моделью остеогенной дифференцировки.

В работе были сформированы сфероиды двух типов: из остеобластов и совместной культуры остеобластов с эндотелиальными клетками человека (HUVEC). Для сборки сфероидов использовали два подхода: метод висячей капли и метод с использованием агарозных молдов с углублениями. Клетки культивировали в стандартной и остеогенной среде. Жизнеспособность клеток в составе сфероидов оценивали с использованием теста Alamar Blue. Для характеристики сфероидов и верификации экспрессии остеогенных и эндотелиальных маркеров использовали метод иммуноцитохимического окрашивания (ИЦХ). Для оценки ангиогенного потенциала сфероиды культивировали в гидрогеле на основе желатина и коллагена I.

Метод висячей капли не обеспечивал формирование стабильных сфероидов, тогда как использование агарозных молдов позволяло воспроизводимо получать клеточные агрегаты за счет самоорганизации клеток на неадгезивной поверхности агарозы. Оценка жизнеспособности с использованием Alamar Blue показала, что клетки в сфероидах из моно- и сокультуры сохраняли высокую метаболическую активность. Методом ИЦХ было подтверждено наличие остеобластов и эндотелиальных клеток в составе гибридных сфероидов, определена их пространственная локализация, а также выявлено повышение экспрессии α-SMA в сокультуре сфероидов в условиях остеогенной дифференцировки. При культивировании в гидрогеле HUVEC мигрировали за пределы сфероидов и формировали между собой связанную сосудистоподобную сеть.

Таким образом, предложенный подход на основе агарозных молдов позволяет воспроизводимо получать сфероиды из моно- и сокультур остеобластов и эндотелиальных клеток, сохраняющие высокую метаболическую активность и способность к формированию сосудистоподобных структур. Разработанная модель может быть использована для дальнейшего изучения клеточных взаимодействий в 3D-культуре, а также при разработке васкуляризированных тканеинженерных конструкций костной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-25-00280).

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КУЛЬТИВИРУЕМОЙ ФРАКЦИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА УРОВЕНЬ ТКАНЕВОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ АУТОИММУННОМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТЕ

Сигарева Л.П.[1*], Михайлова Е.В.[1,2], Кромский С.В.[1], Александров В.Н.[1]

1. *ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail[*]: sigaryowa@yandex.ru

Аутоиммунные гломерулонефриты (АГН) –иммуноопосредованные провоспалительные заболевания почек. Диагностируются по протеинурии в анализах мочи, когда значительная часть фильтрующих структур почек уже затронута воспалительным процессом. Мезенхимные мультипотентные стромальные клетки (ММСК) обладают доказанным регенеративным и противовоспалительным потенциалом в биомедицине. ММСК, содержащиеся в культивируемой фракции мононуклеарных клеток

костного мозга (КФМК), могут влиять на проявление воспаления на уровне тканей почек, в частности, на количество CD68+ клеток.

Модель активного нефрита Хейманна воспроизводили на крысах породы Вистар двухмесячного возраста (n=10). В качестве контрольной группы взяли здоровых крыс без заболевания (n=5). Эксперимент продолжали 120 сут. На 22 и на 29 сут моделирования крысам провели системную трансплантацию КФМК во внешнюю ярёмную вену в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток на кг. Источником аллогенных КФМК являлся костный мозг здоровых крыс четырёхмесячного возраста. КФМК культивировали традиционным образом.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии маркера CD68 проводили с использованием полимерной системы визуализации анти-кролик-анти-мышь EnVision FLEX (Dako, Дания). Результат оценивали по 20 полям зрения в программе Zen 2 lite (Carl Zeiss AG, Германия). Данные представили в виде медианы и значений первого и третьего квартилей (Me [Q1, Q3]), анализ провели с применением анализа ANOVA on ranks для ненормального распределения данных с апостериорным тестом Данна. Различия считали достоверными при p<0,05.

У здоровых крыс долю CD68+ клеток оценили на уровне 0,94 [0,78, 1,06] %. Развитие модели нефрита Хейманна сопровождалось увеличением уровня макрофагов в почечной ткани до 2,51 [1,94, 2,81] %. Трансплантация КФМК привела к статистически значимому уменьшению воспалительной реакции до значений 1,15 [1,03, 1,24] %, сопоставимых со здоровым контролем.

Трансплантация аллогенных КФМК улучшает течение воспалительного процесса в почках. Полученный результат подтверждает актуальность разработок с применением КФМК в терапии АГН.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К 3D БИОПЕЧАТИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Слепухина М.В.[1]*, Котенева П.И.[1], Бикмулина П.Ю.[1], Кошелева Н.В.[1], Шпичка А.И.[1], Тимашев П.С.[1]

1. *Институт регенеративной медицины, Научно-технологический парк биомедицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия*

E-mail: maria.slepukhina@mail.ru*

Введение: Трёхмерная биопечать является перспективным направлением регенеративной медицины для создания тканеинженерных конструкций. Одним из наиболее эффективных подходов является использование клеточных сфероидов, обеспечивающих естественные межклеточные взаимодействия, высокую жизнеспособность клеток и микроокружение, близкое к условиям *in vivo*. Особый интерес представляют сфероиды эпителиальных клеток как основа для создания биоэквивалентов эпителиальной ткани.

Цель: разработка протоколов 3D-биопечати функциональных биоэквивалентов эпителиальной ткани с помощью сфероидных культур, а также подбор оптимальных биологических и количественных параметров для биофабрикации.

Материалы и методы: использовали эпителиальную клеточную линию ARPE-19. Сфероиды формировали на неадгезивных агарозных планшетах (Microtissue, США). Иммуноцитохимический анализ выполняли с использованием антител к ZO-1, виментину и фибронектину. Биопечать осуществляли с помощью экструзионного биопринтера CELLINK BioX с применением биочернил на основе фибрина и желатина. Были получены конструкции, содержащие сфероиды ARPE-19 и конструкции с подлежащим слоем мезенхимальных стромальных клеток десны (МСК-Д). Жизнеспособность оценивали методом Live/Dead, морфологические параметры — в программе ImageJ (NIH, США).

Результаты: к 3 суткам сфероиды компактизовались до диаметра 212,2±7,9 мкм, что на 28,2% меньше по сравнению с 1 сутками. В поверхностной зоне сфероидов сохранялось накопление белка плотных контактов ZO-1; также выявлено накопление фибронектина и виментина, указывающее на формирование собственного внеклеточного матрикса и частичный эпителиально-мезенхимный переход. В тканеинженерных конструкциях совместное культивирование сфероидов ARPE-19 с МСК-Д сопровождалось усилением миграции эпителиальных клеток и формированием развитого эпителиального слоя. К 14 суткам площадь эпителиального фронта при со-культивировании достигала 150291±20531 мкм², что в 1,4 раза превышало показатель монокультуры, а его общая протяжённость была больше в 2,6 раза.
Выводы: методом 3D-биопечати получены жизнеспособные биоэквиваленты эпителиальной ткани на основе сфероидов ARPE-19. Со-культивирование с МСК-Д усиливало миграцию эпителиальных клеток и формирование эпителиального фронта, что подтверждает перспективность данного подхода для создания тканеинженерных конструкций эпителиального типа с нативной структурой тканей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Образования и Науки (грант № 075-15-2026-308).

РОЛЬ KLF2 И KLF4 В ПОДДЕРЖАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭНДОТЕЛИЯ И РЕГУЛЯЦИИ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Смирнова Д.В.[1*], Караман И.А.[1], Сердюкова Д.А.[1], Малашичева А.Б.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: smirnovadv@incras.ru*

Эндотелиальные клетки (ЭК) играют ключевую роль в поддержании тканевого гомеостаза, регулируя сосудистый тонус, воспалительные реакции и свойства микроокружения. Через паракринные сигналы и межклеточные взаимодействия ЭК способны влиять на поведение резидентных клеток и их дифференцировку, в частности, в остеогенном направлении. Нарушение функционального состояния эндотелия сопровождается развитием эндотелиальной дисфункции и эндотелиально-мезенхимного перехода (ЭндоМП), характеризующегося утратой эндотелиальных свойств и приобретением мезенхимного фенотипа. Транскрипционные факторы KLF2 и KLF4 играют ключевую роль в поддержании эндотелиального гомеостаза, однако их вклад в ЭндоМП и эндотелий-опосредованную регуляцию дифференцировки в остеогенном направлении остается недостаточно изученным.

Цель исследования – оценить влияние изменения экспрессии *KLF2* и *KLF4* на функциональные свойства ЭК и их способность регулировать остеогенную дифференцировку.

В работе использовали ЭК пупочной вены человека (HUVEC). Модификацию экспрессии *KLF2* и *KLF4* осуществляли методом лентивирусной трансдукции. Молекулярный профиль ЭК оценивали методом RNA-seq и ПЦР-РВ. Влияние модифицированных ЭК на остеогенную дифференцировку оценивали в условиях совместного культивирования с первичными интерстициальными клетками аортального клапана человека (ИКК) и остеобластами (ОБ) методом окраски ализариновым красным.

Активация *KLF2* и *KLF4* в ЭК повышала уровни эндотелиальных маркеров (*NOS3*, *VWF*, *CDH5*) и приводила к изменению экспрессии компонентов внеклеточного матрикса и сигнальных путей Notch и TGF-β. ЭК, трансдуцированные лентивирусными конструкциями, активирующими экспрессию *KLF2* и *KLF4*, при сокультивировании с ИКК или ОБ подавляли остеогенную дифференцировку обоих типов клеток, тогда как ингибирование *KLF2* в ЭК усиливало дифференцировку только ИКК. Кроме того, сверхэкспрессия *KLF2* в ЭК ослабляла остеоиндуктивный эффект совместной активации сигнальных путей Notch и TGF-β и снижала экспрессию маркера ЭндоМП *SNAI2*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что транскрипционные факторы KLF2 и KLF4 являются важными регуляторами функционального состояния ЭК и ограничивают эндотелий-опосредованную остеогенную дифференцировку ИКК и ОБ, что может быть обусловлено подавлением ЭндоМП и модуляцией сигнальных путей Notch и TGF-β.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-15-00280).

ВЛИЯНИЕ БЕЛКА АКТИВИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ (FAPα) НА СОСТАВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА, ПРОДУЦИРУЕМОГО СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ

Степанова Д.В.[1*], Дьячкова У.Д.[1], Рудакова А.О.[1], Толстолужинская А.Е.[1], Басалова Н.А.[1], Ефименко А.Ю.[1], Григорьева О.А.[1]

1. *Медицинский научно-образовательный институт, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: Daniella.stepanova@mail.ru*

Повреждение ткани вызывает активацию стромы и приводит к повышению уровня белка активированных фибробластов (FAPα) в стромальных клетках, что стимулирует их миграцию, пролиферацию, синтез белков внеклеточного матрикса (ВКМ), в том числе коллагенов, фибронектина, ламинина, которые координируют межклеточные взаимодействия. Изменение состава ВКМ может влиять на репарацию и регенерацию тканей: избыточное отложение ВКМ ассоциировано с патологическим фиброзом, тогда как уменьшение его синтеза приводит к нарушению процессов восстановления. FAPα играет важную роль в этих процессах, однако его участие в синтезе ВКМ остается не до конца изученным, поэтому целью нашей работы стало оценить влияние FAPα на состав и строение ВКМ, продуцируемого активированными стромальными клетками. Для этого были использованы клеточные линии фибробластов кожи человека с нокаутом по гену FAPα с использованием системы CRISPR/cas9, модифицированной в никазу, или гиперэкспрессией FAPα путем лентивирусной трансдукции. Полученные клеточные линии, а также контрольные, культивировали в течение 10 дней с добавлением аскорбиновой кислоты для получения клеточных пластов. Затем проводили процедуру децеллюляризации полученных пластов путем последовательной обработки детергентом CHAPS и ДНКазой I. Далее методом дот-блота полуколичественно оценивали уровень

белков в децеллюляризованном ВКМ (дВКМ). Мы обнаружили, что дВКМ, синтезированный клетками с гиперэкспрессией FAPα, содержал значимо больше коллагена IV типа, фибронектина с внеклеточным доменом А (EDA-FN) и ламинина по сравнению с дВКМ контрольных фибробластов, а уровни коллагена I типа и фибронектина имели тенденцию к повышению. С другой стороны, нокаут по гену FAPα приводил к значимому снижению уровня указанных белков в дВКМ, синтезированном этими клетками. Известно, что EDA-FN напрямую влияет на дифференцировку миофибробластов, необходимых для заживления, а коллаген IV и ламинин являются участниками ангиогенеза, поэтому мы можем предполагать улучшение регенераторных свойств дВКМ, полученного от клеток с гиперэкспрессией FAPα. Таким образом, FAPα, рассматриваемый как маркер активированной стромы, влияет на состав и строение ВКМ, продуцируемого стромальными клетками, и за счет этого может оказывать влияние на регуляцию процессов восстановления тканей после повреждения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №23-15-00198-П).

СОЗДАНИЕ ПРОТЕОМНОГО РЕСУРСА КАИРСКОЙ ИГЛИСТОЙ МЫШИ (ACOMYS CAHIRINUS), РЕГЕНЕРИРУЮЩЕГО ГРЫЗУНА

Ушаков Р.Е.[1*]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: uszakow@yandex.ru*

Иглистые мыши (род *Acomys*) - уникальный пример млекопитающих, способных к безрубцовой регенерации многих тканей и органов. В этом качестве *Acomys* представляют собой многообещающую модель для регенеративной биологии и

медицины. Хотя феномен регенерации *Acomys* изучается уже 15 лет, до сих пор не существует опубликованного протеома ни одного вида *Acomys*, поэтому мы приступили к решению этой проблемы.

Единственный доступный на сегодня транскриптом каирской иглистой мыши (*Acomys cahirinus*, один из наиболее изучаемых видов *Acomys*) представляет собой *de novo* сборку из коротких прочтений Illumina. Для улучшения качества транскриптомной сборки и будущей протеомной базы данных, мы пересобрали транскриптом ассемблером Stringtie, предварительно картировав RNA-seq прочтения на референсный геном. Оценка полноты новой сборки с помощью анализа пересечений по базе данных генов-ортологов млекопитающих mammalia_odb10 показала существенное улучшение по сравнению с *de novo* сборкой (BUSCO completed 90% против 80%). В качестве дополнительной валидации улучшения качества сборки, мы убедились в полноразмерности некоторых длинных транскриптов (например, фибронектина), которые были фрагментированы в *de novo* сборке.

Полученный транскриптом был транслирован в аминокислотные последовательности с помощью Transdecoder. Затем, в качестве демонстрации применения ресурса, мы проанализировали вероятность влияния аминокислотных замен в ряде белков системы гемостаза *A. cahirinus* на их функцию с помощью программы SIFT. Выбор системы гемостаза обусловлен тем, что свёртывание крови является первым этапом в восстановлении повреждённых тканей, и способность *Acomys* к мультиорганной безрубцовой регенерации может быть связана с эволюционными изменениями этой системы. Анализ выявил ряд аминокислотных замен в высококонсервативных позициях функциональных доменов физиологически взаимосвязанных между собой белков - например, в протромбине, факторах свёртывания VII, X, XIII, серпине A5, плазминогене, tPA и PAI-1. Эти замены могут объяснять описанный феномен ускоренной коагуляции у *A. cahirinus* (Filatov et al., 2024). В дальнейшем, планируется аннотировать протеом для удобства использования.

Полученный протеомный ресурс может быть использован для генерации биологических гипотез, моделирования трёхмерных структур белков, биотехнологических нужд, для масс-спектрометрии и других задач, возникающих при изучении *Acomys*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-75-00066).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СЕКРЕТОМА ФИБРОБЛАСТОВ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ РУБЦОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Ферапонтова М.Ю.[1*], Чижикова Г.А.[1], Михайлова Н.А.[1], Юдинцева Н.М.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: ferapontovamaria2005@yandex.ru*

При патологическом характере заживления поврежденной кожи формируются гипертрофические и келоидные рубцы. Фибробласты (Фб) патологических рубцов оказывают активное паракринное влияние посредством секретируемых факторов (включая белки внеклеточного матрикса (ВКМ), факторы роста, цитокины и др) на нормальные клетки микроокружения рубца и запускают каскад реакций, ведущих к активации профибротических путей. Кроме нарушения баланса между синтезом и реорганизацией белков ВКМ, Фб рубцов (миофибробласты) способны к контракции матрикса и обладают повышенной клеточной подвижностью.

Целью работы была оценка влияния среды, кондиционированной клетками линии HTSF-1 на изменение подвижности клеток линии NDF-1.

Материалы и методы: использовали пациент-специфичные клеточные линии HTSF-1 (Hypertrophic Scar Fibroblast) (Фб

гипертрофического рубца кожи человека) и NDF-1 (Normal Dermal Fibroblast) (Фб нормальной кожи) (Центр коллективного пользования «Коллекция культур позвоночных» ИНЦ РАН). Для оценки клеточной подвижности использовали среду, кондиционированию HTSF-1, в качестве контроля - стандартные условия культивирования клеток. Оценку клеточной подвижности выполняли с использованием прижизненной конфокальной микроскопии (модель зарастания раны). Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных прибора Yokogawa CQ1, статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Excel.

Результаты: под влиянием среды, кондиционированной клетками линии HTSF-1, клеточная подвижность NDF-1 по сравнению с контролем существенно возрастала ($p < 0,05$).

Выводы: полученные результаты продемонстрировали активное влияние секретома клеточной линии HTSF-1 на изменение клеточной подвижности нормальных клеток в условиях in vitro, что может свидетельствовать о приобретении ими активного профибротического фенотипа. Для исследования механизма влияния и выявления белков-мишеней требуются дальнейшие исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта в форме субсидии Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2025-482).

ИММОРТАЛИЗАЦИЯ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ОСТЕОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ

Флорен Д.Д.[1*], Караман И.А.[1], Цыпилева А.С.[1], Авдеев А.И.[2], Малашичева А.Б.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБУ «НМИЦ ТО имени Р.Р. Вредена», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: floren@incras.ru*

Первичные культуры остеобластов – ценная модель для изучения ремоделирования костной ткани, однако их применение ограничено конечной пролиферацией: по мере увеличения числа пассажей клетки необратимо останавливают цикл и меняют функциональную активность, вступая в репликативную сенесценцию. Преодоление этих ограничений возможно посредством иммортализации, одним из наиболее широко используемых методов которой является экспрессия каталитической субъединицы теломеразы (hTERT).

Целью данной работы являлось получение иммортализованной линии остеобластов человека путем лентивирусной трансдукции hTERT и оценка сохранности пролиферативного и дифференцировочного потенциала.

Первичная культура остеобластов получена из фрагментов бедренной кости, взятых в ходе ортопедической операции. Лентивирусную трансдукцию осуществляли конструкцией pVLT-EF1a-hTERTpuro с последующей селекцией на основе пуромицина. Пролиферативную активность оценивали по уровню удвоений популяции (PDL). Клеточное старение детектировали по активности SA-β-Gal и экспрессии компонентов SASP методом ПЦР в реальном времени. Сохранение тканеспецифичного фенотипа и дифференцировочного потенциала подтверждали иммуноцитохимическим анализом, окрашиванием ализариновым красным и оценкой экспрессии маркеров остеогенеза (*RUNX2, SPP1,*

COL1A1, ALPL) на ранних, поздних и иммортализованных культурах.

Получена клеточная линия, стабильно пролиферирующая на протяжении более 70 пассажей и не проявляющая признаков сенесценции по данным SA-β-Gal, тогда как интактные клетки к 14-му пассажу исчерпывали пролиферативный потенциал и переходили в сенесценцию. Иммортализованные остеобласты сохраняли веретеновидную морфологию и фибриллярную организацию виментина, характерные для клеток мезенхимального происхождения. Иммортализованная линия демонстрировала повышенную экспрессию *RUNX2*, *SPP1*, *COL1A1* и *ALPL* относительно сенесцентных клеток и сохраняла способность к минерализации матрикса, сопоставимую с ранними пассажами.

Таким образом, полученная иммортализованная линия остеобластов сохраняет пролиферативную активность, мезенхимальный фенотип и способность к остеогенной дифференцировке при длительном культивировании, что делает её перспективной моделью для фундаментальных исследований и тканевой инженерии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2025-482).

ВЛИЯНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ AMPK НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Хохлова А.Р.[1*], Неганова И.Э.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: pollkhokhlova11@gmail.com*

Остеопороз (ОП) – системное метаболическое, полигенное заболевание, связанное с нарушением баланса между костеобразованием и резорбцией, опосредующим высокий риск переломов. Эффективность остеогенной дифференцировки (ОД) мезенхимных стромальных клеток (МСК) зависит от генетического фона пациента. Пациент-специфические клеточные линии (ПСКЛ), несущие сочетание трех гомозиготных полиморфизмов, SNP, *ADRB2* rs1042713 AA + *FSHR* rs6166 AA + *TSHR* rs1991517 CC, характеризуются низким остеогенным потенциалом и отсутствием минерализации внеклеточного матрикса (ВКМ). АМФ-активируемая протеинкиназа (AMPK) регулирует клеточный энергетический гомеостаз и участвует в ремоделировании костной ткани (КТ). Изучение роли AMPK в остеобластогенезе на моделях ОП с применением ПСКЛ позволит определить роль AMPK как потенциальной про-остеогенной мишени.

Цель работы: оценить влияние фармакологической активации AMPK на ОД ПСКЛ с различными сочетаниями SNP от пациентов с остеопорозом и от контрольных пациентов (со случайными переломами).

Материал и методы: исследовали роль метформина, соединений C24 и IM156 (прямых активаторов AMPK). Цитотоксичность препаратов оценивали MTT-тестом. Минерализацию ВКМ на 21 ОД оценивали окрашиванием Ализариновым красным. Экспрессию генов-маркеров ОД *RUNX2, COL1A1, SP7, SPARC, BGLAP,* а также

генов α-субъединиц AMPK *PRKAA1* и *PRKAA2* определи методом количественного ПЦР в реальном времени.

Результаты: показано, что в ПСКЛ, несущих данный набор SNP и полученных от пациентов с ОП и Д2Т или ожирением –не происходит минерализации ВКМ, что согласуется с низким уровнем экспрессии ключевых генов-маркеров ОД. При этом в таких ПСКЛ уровень экспрессии обоих субъединиц AMPK (*PRKAA1 и PRKAA2)* был значительно снижен в ОД среде по сравнению с уровнем экспрессии в контрольных линиях. Применение метформина (250-123 μM), C24 (200-100 μM) и IM156 (150-75nM) значительно повысило уровень минерализации, что предполагает, что фармакологическая активация AMPK способствует ОД и минерализации ВКМ. Дальнейшие исследования позволят определить наиболее эффективные активаторы AMPK для поддержания остеобластогенеза и определить их роль, как потенциальных проостеогенных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-15-00216 ИН).

РАЗРАБОТКА ИНСТРУМЕНТАЛЬНОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ РНК СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ В НЕЙРОГЕНЕЗЕ: СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ ИПСК

Цыганова А.С.[1*], Богомазова А.Н.[1], Еремеев А.В.[1]

1. *ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства России», Москва, Россия*

E-mail: arina.pikina@yandex.ru*

Одним из подходов к идентификации ключевых генов-регуляторов нервного развития является анализ моногенных нейродегенеративных заболеваний. Было показано, что в ряде

случаев нарушения нейрогенеза и связанные с этим патологии были ассоциированы с белками с РНК-связывающим мотивом (РНК-свМБ), роль которых в равитии нервной системы на данный момент не исследована. Однако факт, что РНК-связывающие белки участвуют в широком спектре процессов, включая регуляцию транскрипции, посттранскрипционные модификации, позволяет предположить, что ряд РНК-свМБ могут быть важными регуляторами нейрогенеза. Многофункциональным и удобным объектом для моделирования нарушения функции одного из таких белков *in vitro* являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), а создание изогенных клеточных линий позволяет идентифицировать эффект без влияния генетического фона. В данной работе мы получили изогенные линии ИПСК с нокаутом и избыточной экспрессией одного из РНК-свМБ в целях дальнейшего моделирования нейрогенеза и выявления роли данного гена в этом многоуровневом процессе.

Для реализации CRISPR-Cas9-нокаута мы тестировали варианты плазмидных векторов с различными последовательностями направляющих РНК на клетках линии HEK293. Наиболее эффективный вектор использовали для трансфекции линии ИПСК здорового донора. Среди 41 отобранного клона одиночных клеток было выявлено 4 гомозиготных с подтверждённой делецией нечётного количества нуклеотидов, приводящей к сдвигу рамки считывания. Для одного из выявленных гомозиготных клонов с нокаутом РНК-свБ была подтверждена плюрипотентность по синтезу и экспрессии специфичных маркеров OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-4, TRA1-60, DPPA5, SALL4, FOXD3, C-MYC, а также спонтанной дифференцировкой в производные трёх зародышевых листков в эмбриоидных тельцах.

Для получения избыточной экспрессии РНК-свБ использовали тетрациклин-зависимую векторную систему с кодирующей последовательностью, которая была доставлена в ИПСК лентивирусной трансдукцией. Факт интеграции в отобранных клонах одиночных клеток был подтверждён с помощью ПЦР.

Полученные клеточные линии послужат инструментом для исследования молекулярных механизмов нейрогенеза и вклад РНК-свМБ в них.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПОВЕРХНОСТИ КОМПОЗИТНЫХ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ ПКЛ/ПЭГ НА ПОВЕДЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Чабина А.С.[1*], Богданова Д.Н.[1], Кригер Д.В.[1], Нащекин А.В.[2], Просалов Н.Д.[2], Темников О.В.[2], Нащекина Ю.А.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБУН Физико-технический институт имени А. Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: Chabina.a@incras.ru*

Поли-ε-капролактон (ПКЛ) – перспективный полимер для тканевой инженерии, однако высокая гидрофобность ПКЛ ограничивает клеточную адгезию, вследствие чего требуется дополнительная поверхностная модификация. Перспективным подходом является формирование композитных пленок на основе ПКЛ и полиэтиленгликоля (ПЭГ) с последующим частичным вымыванием дисперсной фазы ПЭГ. Это позволяет не только повысить гидрофильность поверхности (химический фактор), но и сформировать развитую топографию за счет образования пор (физический фактор). В настоящей работе была проведена оценка влияния ПЭГ с различной молекулярной массой (1, 2, 4, 6, 8 и 15 кДа) на физико-химические свойства композитных пленок, а также на поведение мезенхимальных стромальных клеток (МСК).

Методами поляризационной, сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопий установлено, что топография контролируется термодинамическими и кинетическими факторами, зависящими от молекулярной массы ПЭГ. Наибольшие сферолиты (786 мкм²)

формируются при 4 кДа, тогда как ПЭГ 6 кДа обеспечивает наиболее выраженное фазовое разделение, крупные поры и минимальную шероховатость в 14,1 нм. Наличие остаточного ПЭГ определяли методом ИК-спектроскопии и количественно методом спектрофотометрии, показав наличие остаточных -ОН групп на поверхности всех пленок, что увеличивало смачиваемость ПКЛ, особенно для ПЭГ 6 кДа. С помощью кристаллического фиолетового и флуоресцентного окрашивания с антителами к винкулину показано, что клеточная адгезия и пролиферация значимо возрастают на модифицированных поверхностях, достигая максимума для ПЭГ 6 кДа (поверхность с наибольшей гидрофильностью), при этом МСК формируют развитую сеть актиновых филаментов и крупные фокальные контакты. Трекинг одиночных клеток показал, что химическая природа ПЭГ оказывает доминирующее влияние на скорость миграции МСК, тогда как роль топографии менее значима. На плёнках с ПЭГ 6 кДа также обнаружена наиболее активная миграция МСК.

Таким образом, композитные плёнки ПЭГ 6 кДа создают оптимальный баланс смачиваемости и микрорельефа, обеспечивая эффективную адгезию, пролиферацию и миграцию клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-74-20120-П).

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ МАТРИЦЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ КАК ОСНОВА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ МИОМЕТРИЯ *IN VITRO*

Шкорубская О.А.[1, 2*], Домнина А.П.[1], Кунеев И.К.[1], Нащекина Ю.А.[1], Соколова А.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: soa@asno.ru*

Исследование физиологии и патологий миометрия человека *in vivo* затруднено, поэтому имеется необходимость создания *in vitro* моделей. Классическое 2D-культивирование на пластике не воспроизводит сложную трехмерную архитектуру и механические свойства живой ткани. В последние годы активно развиваются технологии тканевой инженерии с использованием мезенхимных стволовых клеток (МСК), а также биосовместимых растительных скаффолдов, полученных путем децеллюляризации. Целью данной работы была оценка потенциала 3D-культивирования эндометриальных мезенхимных стволовых клеток (эМСК) человека, полученных из неинвазивного источника, участков эндометрия, содержащихся в менструальной крови, на децеллюляризованных матрицах из пера зеленого лука в качестве платформы для последующей дифференцировки в миогенном направлении для создания трехмерной модели миометрия. В работе использованы матрицы из пера зеленого лука, полученные путем децеллюляризации в 1%-ом додецилсульфате натрия с последующей отмывкой в фосфатно-солевом буферном растворе, и покрытые коллагеном I типа. Зеленый лук представляет особый интерес благодаря упорядоченной ориентации целлюлозных волокон, напоминающей структуру мышечных пучков.

Показано, что эМСК на целлюлозных матрицах из пера зеленого лука сохраняют жизнеспособность и пролиферируют. Сохраняется также иммунофенотип мезенхимных клеток при культивировании на целлюлозном каркасе (CD90+, CD73+, CD105+, CD44+, CD45-, CD34-, HLA-DR-). Была обнаружена выраженная пространственная реорганизация клеток: эМСК успешно адгезировали на поверхности матрицы и выстраивались вдоль продольной оси целлюлозных ячеек. Данная ориентация клеток имитирует естественную организацию гладкомышечных клеток в миометрии.

Исследования с помощью кальциевого индикатора FluoriCa-8 AM показали, что при добавлении окситоцина в 3D-культуре регистрируется увеличение внутриклеточного кальция, что подтверждает функциональную активность клеток.

По результатам проведенной работы было установлено, что скаффолды из пера зеленого лука обеспечивают направленную ориентацию клеток и поддерживают их специфическую функциональную активность, включая увеличение внутриклеточного кальция в ответ на гормональную стимуляцию. Поскольку для эМСК в литературе описана способность дифференцироваться в гладкомышечном направлении, разработанный метод 3D-культивирования является перспективным подходом для последующего создания моделей, направленных на изучение физиологии и патологий миометрия.

Биофизика и моделирование биологических систем

ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ АГЕНТОВ, ЭНФУМАФУНГИНА И ИБРЕКСАФУНГЕРПА, НА ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Архипов А.В.[1*], Ефимова С.С.[1], Остроумова О.С. [1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

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

Вульвовагинальный кандидоз – одна из наиболее распространенных разновидностей вагинальной инфекции, вызываемой *Candida* spp. (Sobel et al., 2024). Потенциальными терапевтическими агентами являются тритерпеноиды, в частности, энфумафунгин (ЭНФ) и ибрексафунгерп (ИБФ) (Vicente et al., 2024). Основной механизм действия указанных соединений заключается в ингибировании β-(1,3)-D-глюкансинтазы *Candida* spp., фермента, синтезирующего основной компонент клеточной стенки грибов (Hector et al., 2011). Принимая во внимание амфифильную природу ЭНФ и ИБФ, можно предположить альтернативный механизм их действия, ассоциированный с липидной мембраной, в которую встроена β-(1,3)-D-глюкансинтаза. Целью работы было исследование способности ЭНФ и ИБФ влиять на физические свойства липидных бислоев, имитирующих мембраны клеток млекопитающих и грибов. Для моделирования мембран клеток млекопитающих и грибов использовали смесь пальмитоилолеилфосфатидилхолина (ПОФХ) с холестерином (ХОЛ) или эргостерином (ЭРГ) (67/33 мол%) соответственно.

С помощью флуориметрии утечки кальцеина из ПОФХ/ХОЛ и ПОФХ/ЭРГ липосом показано, что в концентрации 5 мкМ ЭНФ слабо влияет на проницаемость везикул (утечка маркера из липосом не превышает 10% независимо от их стеринового состава). При этом в аналогичной концентрации ИБФ увеличивает проницаемость ХОЛ- и ЭРГ-содержащих липосом для флуоресцентного маркера до 50%. Полученные результаты указывают на более выраженный

эффект ИБФ по сравнению с ЭНФ и отсутствие селективности мембранного действия обоих антибиотиков.
Обсуждаются механизмы высвобождения флуоресцентного красителя из везикул под действием тестируемых соединений и роль увеличения проницаемости мембран в токсичности этих антимикотиков.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания ФГБУН ИНЦ РАН (проект № FMFU-2026-0009).

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ НАПРЯЖЕНИЙ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ГЕОМЕТРИЕЙ КАМЕРЫ ДЛЯ *EX OVO* КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, НА РАЗВИТИЕ СОСУДОВ ЖЕЛТОЧНОГО МЕШКА

Васильева А.А.[1*], Кучербаева А.Г[2]., Степанов М.Е.[2], Мун В.В.[2], Егорова Т.В. [2]

1. *ФГБОУ ВО «Институт биологии и химии МПГУ», Москва, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Институт физики, технологии и информационных систем МПГУ», Москва, Россия*

E-mail:* Alena0515A@yandex.ru

Физические силы и вызываемые ими напряжения играют важную роль в морфогенезе. В ходе васкуло- и ангиогенеза механические сигналы формируются кровотоком и передаются через внеклеточный матрикс. Механическое растяжение тканей может индуцировать ремоделирование сосудов и васкулогенез независимо от локальной гипоксии. Одним из способов изменения распределения напряжений является изменение геометрии ткани. Желточный мешок куриного эмбриона представляет удобную модель для изучения этих процессов.

Целью настоящей работы была оценка влияния геометрии камер для *ex ovo* культивирования на морфологию развивающейся сосудистой сети желточного мешка.

Были изготовлены камеры круглой, квадратной и каплевидной формы площадью 25 см² из биосовместимого PLA пластика. Эмбрионы линии Cobb-500 на стадии HH20 переносили в камеры и культивировали *ex ovo* 72 ч при 37.5 °C и влажности 65 %. Сосудистую сеть фотографировали, морфометрию проводили в AngioTool 2.0. Индекс упорядоченности ветвления сосудов рассчитывали по Guidolin et al. (2004), пространственное распределение ветвлений оценивали методом Шолля.

В пилотной серии индекс упорядоченности ветвления, отражающий неоднородность длин сегментов между соседними точками ветвления, проявлял тенденцию к увеличению в ряду: круглая, каплевидная, квадратная форма. Анализ Шолля выявил тенденцию к усилению ветвления вблизи стенок квадратных камер и в области угла каплевидных камер. Это согласуется с гипотезой о неоднородном распределении механических напряжений, обусловленном геометрией камеры.

Для оценки молекулярных предпосылок механочувствительности сосудистой сети проведён анализ открытых данных РНК-секвенирования единичных клеток желточного мешка куриного эмбриона на 4-е сутки инкубации (Wu et al., 2026). В эндотелиальных клетках выявлена экспрессия генов, связанных с восприятием механических стимулов. Анализ лиганд-рецепторных взаимодействий в CellChat указал на потенциальную коммуникацию между эндотелиальными клетками и мезенхимальной популяцией с признаками предшественников муральных клеток, в том числе посредством путей, связанных с механотрансдукцией и ремоделированием сосудистой стенки.

Таким образом, камеры различной геометрии могут служить простой моделью для изучения влияния механических факторов на развитие сосудистой сети. Планируется увеличение выборки и углублённый биоинформатический анализ данных секвенирования.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 26-12-00514.

УЧАСТИЕ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ В АКТИВАЦИИ ЭНДОГЕННЫХ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ ANO6, НО НЕ ANO1 В КЛЕТКАХ HEK293

Григорьева Е.Р.[1*], Колесников Д.О.[1], Решетин Д.С.[1], Казначеева Е.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: evgenia.grigorieva.23@mail.ru*

Кальций-активируемые белки семейства аноктаминов (ANO), часть из которых формирует кальций-зависимые ионные каналы, а часть - фосфолипидные скрамблазы, играют роль во многих физиологических процессах. Одним из представителей данного семейства является ANO6, выполняющий функции ионного канала и фосфолипидной скрамблазы. Он участвует в минерализации костной ткани (Ousingsawat J. et.al., 2015), слиянии клеток при формировании трофобласта (Zhang Y. et.al., 2020), свертываемости крови (Yang H. et.al., 2012) и других процессах.

Было показано, что эндогенный ANO6 влияет на активность других оверэкспрессированных каналов ANO в клетках HEK293. И при оверэкспрессии ANO6 и ANO1 могут активироваться различными источниками кальция (Ousingsawat J. et. al., 2024). Однако механизм активации эндогенного ANO6 остается неясным.

Мы исследовали эндогенный ANO6 в клетках HEK293 методом локальной фиксации потенциала, регистрируя токи через одиночные ионные каналы и интегральный ток через всю клетку.

С помощью методов нокдауна и оверэкспрессии мы продемонстрировали, что ANO6 участвует в формировании эндогенных CaCC в клетках HEK293. Также в клетках HEK293 мы

зарегистрировали токи через ANO1, которые подавлялись селективным блокатором Ani9.

Показали, что эндогенный ANO6 активируется после опустошения кальциевого депо с выраженной задержкой. Этот ток подавлялся нокдауном ANO6, его ингибиторами. Для установления роли депо-управляемых каналов в регуляции активности ANO6 мы использовали клетки с двойным нокаутом Stim1/Stim2 и оверэкспрессией Stim1/Orai1. В клетках с двойным нокаутом Stim1/Stim2 не было активации ANO6, а в клетках с оверэкспрессией Stim1/Orai1 ток увеличивался. Напротив, токи через ANO1, активированные опустошением кальциевого депо, не зависели от передачи сигналов Stim/Orai.

Также мы использовали С-концевой фрагмент конститутивно-активного сенсора STIM1 с мутацией L251S и доминантно-негативные мутанты Orai1 E106Q. Приложение С-концевого фрагмента STIM1 L251S приводило к активации эндогенных ANO6 в клетках HEK293. А в опытах с оверэкспрессией Orai1 E106Q активность эндогенных ANO6 при опустошении депо нарушалась. Также мы оценили действие селективного блокатора Orai CM4620.

Таким образом, активация эндогенного ANO6 в клетках HEK293 зависит от поступления кальция через депо-управляемые каналы Orai, в то время как эндогенные ANO1 активируются выбросом кальция из эндоплазматического ретикулума.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-74-00104).

МОДЕЛЬ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ НА ПОВЕРХНОСТИ СЛОЖНОЙ ФОРМЫ

Давыденко Б.Н.[1,2*], Дарвиш Д.М.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: davydenkoworkpost@gmail.com*

3D-биопечать является перспективным методом создания трехмерных тканеинженерных конструкций. Заселение таких конструкций клетками может осуществляться как в процессе печати, когда клетки являются компонентом биочернил, так и после нее. Во втором случае возникает задача оценки распределения клеток по поверхности сложной геометрической формы. Такая задача может быть решена при помощи построения математической модели, что стало целью настоящей работы.

Для решения задачи, на биопринтере IronBio X1 были напечатаны скаффолды различной формы. Использовали биочернила на основе коллагена I типа (35 мг/мл), которые фиксировали путем выдерживания конструкции в растворе PBS. Для стерилизации скаффолдов использовали 70% этанол. После отмывки от этанола скаффолды помещали в ростовую среду и хранили при 4ºС до заселения клетками. В качестве модельной клеточной культуры была выбрана линия дермальных фибробластов DF-1. Клетки культивировали на поверхности скаффолда 15 дней. Для визуализации клеток на скаффолде использовали раствор Calcein-AM (ServisBio) в PBS (1:1000).

Первая часть работы была посвящена созданию комплекса алгоритмов машинного зрения для получения информации о распределении клеток на поверхности скаффолда. Исходные данные представляли собой видеозапись экрана микроскопа ZOE (BioRad), полученную при помощи карты видеозахвата. Для охвата большей области образца использовали подвижный стол микроскопа.

Алгоритм сегментации выделял область кадра и распознавал координаты поля зрения. Целевые кадры выделяли на основе траектории движения. Кадры сшивали в одно изображение по методу взаимной корреляции. Информация о фокусном расстоянии и алгоритм адаптивной фокусировки позволяли поддерживать максимальное качество изображения для всей исследуемой области. К полученному изображению применялся алгоритм подсчета клеток. Так удалось реконструировать распределение клеток по осям X, Y, Z, что позволяло оценивать и рельеф скаффолда.

Вторая часть работы представляла собой алгоритм решения модифицированного уравнения Фишера-КПП методом конечных разностей для скаффолда заданной формы. Начальное распределение клеток может быть задано произвольно, либо основываясь на данных эксперимента. Модель учитывает миграцию и пролиферацию клеток, а ее коэффициенты могут быть изменены для моделирования других линий клеток и биочернил. Средняя абсолютная ошибка модели составила 0.0181 ± 0.004, что является достаточно точным для решения поставленной задачи.

ВЛИЯНИЕ КАПСАЗЕПИНА НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ, ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ И МИГРАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА ЧЕЛОВЕКА

Жданова У.А.[1]*, Чубинский-Надеждин В.И.[1], Сударикова А.В.[1]

1. ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: ulyazh04@gmail.com*

Несмотря на общепринятые стратегии лечения лейкозов, опухолевые клетки крови могут проявлять устойчивость к существующей терапии, поэтому необходим поиск новых способов воздействия на них. Известно, что регуляция клеточного цикла, пролиферации, миграции и дифференцировки может

осуществляться через изменения мембранного потенциала. Опухолевые клетки, как правило, обладают более деполяризованным мембранным потенциалом по сравнению со здоровой тканью, что может быть связано с неправильной работой различных ионных каналов. Исследования в области молекулярной онкологии выделяют особую роль каналов ENaC в изменении мембранного потенциала в электроневозбудимых опухолевых клетках, что может представлять один из способов влияния на прогрессирование заболевания.

ENaC являются гетеротримерами и состоят из α, β, γ-субъединиц, в некоторых случаях α-субъединица может заменяться на δ. Ранее нами было показано, что в клетках миелоидного лейкоза линии K562 функционируют ENaC, содержащие δ-субъединицу в своем составе, и активатор δ-ENaC капсазепин стимулирует их активность. Таким образом, целью нашей работы стало изучение влияния капсазепина на активность натриевых каналов в клетках миелоидного лейкоза K562, а также на мембранный потенциал, пролиферативную и миграционную способность исследуемых клеток.

Используя метод патч-кламп мы убедились, что капсазепин стимулирует активность натриевых каналов в клетках K562. На основании рассчитанных электрофизиологических характеристик этих каналов, было установлено, что они относятся к каналам семейства ENaC. Далее с помощью прижизненной флуоресцентной микроскопии мы обнаружили, что капсазепин вызывает деполяризацию мембраны, однако изменение уровня мембранного потенциала могло быть частично вызвано протоком жидкости, который образуется в камере при смене раствора. Затем мы изучили действие капсазепина на функционирование клеток K562. Анализ миграции клеток через полупроницаемую мембрану по градиенту сыворотки показал, что капсазепин снижает миграционную способность этих клеток. А при помощи серии MTT-тестов мы установили, что капсазепин снижает выживаемость и пролиферативную активность клеток K562 через 24 и 48 ч после начала инкубации.

Таким образом, мы показали, что капсазепин стимулирует активность натриевых каналов в клетках миелоидного лейкоза К562, способен влиять на их мембранный потенциал, при этом снижая миграционную способность, выживаемость и пролиферативную активность этих клеток.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРЕТИЧНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ ΔFN3 И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С ЦИТОКИНАМИ

Зарайский А.А.[1,2*], Борисевич С.С.[1,3], Алексеева М.Г.[2], Штиль А.А.[1,4], Даниленко В.Н.[2]

1. *Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия*
2. *ФГБУН Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва, Россия.*
3. *ЦКП «Сибирский кольцевой источник фотонов», Кольцово, Россия*
4. *ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия*

E-mail: zarajskija@gmail.com*

Изучение молекулярных механизмов взаимодействия в системе «микробиота – хозяин» является одной из актуальных задач биомедицины. Отдельный интерес представляют белки, содержащие домены фибронектина третьего типа (ΔFN3). Расположение на внешней поверхности клеточной стенки позволяет им напрямую контактировать с окружающей средой кишечника хозяина и взаимодействовать с её цитокинами. Определить сайты связывания при таких взаимодействиях возможно с помощью методов *in silico* (Alekseeva et al., 2025).

В настоящей работе использованы методы белкового дизайна и молекулярного докинга. В качестве рецепторов рассмотрены четыре белка из группы ΔFN3, выделенных из микроорганизмов рода *Bifidobacterium* кишечной микробиоты человека. На основе их

аминокислотных последовательностей осуществлено предсказание третичных структур с использованием актуальных моделей искусственного интеллекта. Кандидаты с наибольшими значениями глобальной метрики оценки точности pTM были использованы в качестве мишеней для белок-белкового докинга по протоколу PIPER. В качестве лиганда применялась молекула интерлейкина-6 (IL-6, PDB id: 1ALU) – одного из ключевых провоспалительных цитокинов. Результаты докинга ранжировались по метрике pose score, оценивающей качество пространственной укладки комплекса ΔFN3 – IL-6.

Полученные *in silico* комплексы свидетельствуют о вероятном существовании механизма связывания молекулы IL-6 с ΔFN3 в N-концевых регионах последнего. Понимание данного механизма позволит продвинуться в изучении роли микробиоты в регуляции иммунитета человека. В перспективе это позволит разрабатывать рекомбинантные белковые ингибиторы для купирования патологического цитокинового шторма.

МЕМБРАННАЯ АКТИВНОСТЬ ЦЕРАТОТОКСИНА В ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА

Зарипов И.И.[1*], Злодеева П.Д.[1], Ефимова С.С.[1], Остроумова О.С.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

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

В условиях роста устойчивости бактерий к существующим препаратам особый интерес представляет изучение антимикробных пептидов. Одним из таких пептидов является цератотоксин А (CtxA), обладающий антибактериальным действием (Marri et al., 1996). Антимикробное действие CtxA коррелирует с его способностью формировать ион-проницаемые поры в липидных мембранах (Saint et al., 2003). Однако молекулярные механизмы

порообразующей активности CtxA остаются недостаточно ясными. Целью работы стало установление молекулярных механизмов формирования пор CtxA в липидных бислоях различного состава.

Липидные бислои были сформированы по методу Монтала и Мюллера (Montal and Mueller, 1972) из 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ДФФХ) и 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфо-*L*-серина (ДФФС), а также смесей 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ДОФЭ) и 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфо-*L*-серина (ДОФС), 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ПОФЭ) и 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфо-*L*-серина (ПОФС) в разных молярных соотношениях в 1 М растворе KCl (pH 7.4).

Введение CtxA с одной стороны ДФФХ- и ДФФС-мембран не вызывало ступенеобразных флуктуаций тока, а увеличение концентрации токсина до 475 ± 15 нМ приводило к разрушению бислоев. Увеличение молярной доли ДОФС в ДОФЭ/ДОФС-бислоях приводило к росту пороговой концентрации CtxA, однако выраженных ступенеобразных флуктуаций тока зарегистрировано не было. В случае ПОФЭ/ПОФС-мембран при концентрации пептида 135 ± 40 нМ наблюдались одиночные каналы, характеризующиеся многоуровневой проводимостью со средней величиной около 0.14 нСм при трансмембранном напряжении 150 мВ.

Полученные результаты позволяют заключить, что мембранная активность CtxA зависит от липидного состава бислоя. Способность к проявлению порообразующей активности CtxA при переходе от ДОФЭ/ДОФС- к ПОФЭ/ПОФС-мембранам может указывать на бóльшую активность CtxA в бислоях, содержащих липиды с насыщенными ацильными цепями.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-14-00162).

ПОИСК РЕГУЛЯТОРОВ ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ДАПТОМИЦИНА

Злодеева П.Д.[1*], Ефимова С.С.[1], Остроумова О.С.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

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

Даптомицин – циклический липопептид, антибиотик «последней надежды» в борьбе с инфекциями, вызываемыми лекарственно-устойчивыми патогенами. Мишенями действия даптомицина служат компоненты мембран грамположительных бактерий: фосфатидилглицерин (ФГ) (Chen et al., 2014) и липид II (Grein et al., 2020), молекула-предшественник в синтезе пептидогликана (ПГ). Ряд исследований свидетельствует о порообразующем механизме действия даптомицина (Seydlová et al., 2018; Zhang et al., 2014).

В связи с увеличением использования антибиотиков «последней надежды» в условиях роста лекарственной устойчивости необходимы новые подходы к снижению нежелательных эффектов (Patel et al., 2023; Papadopoulos et al. 2006) и повышению их эффективности. Целью работы стал поиск регуляторов порообразующей активности даптомицина, опосредованного изменением физических параметров липидного бислоя. Для моделирования клеточной стенки грамположительных бактерий использовали ФГ-мембраны в отсутствие и в присутствии 5 мол.% ПГ *Staphylococcus aureus*. Лизофосфатидилхолин (ЛизоФХ) в концентрации 7.5 мкМ, индуцирующий положительную спонтанную кривизну монослоя (Fuller and Rand, 2001), использовали в качестве модулятора эластических свойств бислоев. Снижающий дипольный потенциал флоретин и его повышающий RH 421 (Efimova et al., 2014) в концентрациях 20 и 5 мкМ, соответственно, использовали в качестве регуляторов электрических свойств мембран.

С использованием электрофизиологического метода было показано, что ЛизоФХ увеличивает даптомицин-индуцированный

трансмембранный ток, протекающий через ФГ- и ФГ/ПГ-мембраны примерно в 100 раз. Флоретин способствует росту даптомицинового тока в ФГ- и ФГ/ПГ-мембранах в 14 и 4 раз, соответственно. RH 421 также потенцирует активность даптомицина в ФГ-бислоях (увеличение тока в 5 раз) и обогащенных ПГ мембранах (увеличение в 2 раза).

Сопоставление результатов с данными, полученными ранее для другого циклического липопептида, полимиксина Б (Zakharova et al., 2022), позволяет предполагать, что общим механизмом усиления порообразующего действия этих антибиотиков может служить изменение эластических свойств липидных мембран.

Таким образом, агенты, индуцирующие положительную кривизну монослоя, могут быть рассмотрены в качестве синергистов порообразующей активности даптомицина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 25-14-00162).

АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ТРАНСТИОЭТЕРИФИКАЦИИ UBA1-E2 С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЛИТ-СИСТЕМ FAST И NANOLUC

Иванова К.А.[1], Белогуров А.А.[2*]

1. *МФТИ, Физтех, Долгопрудный, Россия*
2. *ГНЦ ИБХ РАН, Москва, Россия*

E-mail: belogurov@ibch.ru*

Убиквитин-протеасомная система (УПС) контролирует деградацию белков и важнейшие для деятельности клетки сигнальные каскады. Ключевым компонентом УПС является убиквитин (Ub), с целью изучения которого ранее использовался ряд методов, таких как тандемная масс-спектрометрия, введение мутаций и иммунопреципитация (Ivanova et al., 2024). Однако в случае детекции белок-белковых взаимодействий Ub рациональным представляется применение систем комплементации белков. Они

характеризуются наличием репортерного белка, разделенного на неактивные фрагменты, восстанавливающие активность при их расположении в непосредственной близости.

В данном исследовании для анализа кинетики загрузки Ub на убиквитин-лигазу E1 (UBA1) и сборки полиубиквитиновых цепей была разработана биофизическая методика на основе сплит-систем – флуоресцентной FAST (Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag) и люминесцентной NanoLuc. FAST разделили на фрагменты N-FAST и C-FAST, слитые с двумя Ub с различными функциональными лизинами. В присутствии взаимодействия между Ub, фрагменты N-FAST и C-FAST сближались и восстанавливали флуоресцентную активность при связывании с производным роданина HBR-DOM2. NanoLuc была разделена на пептиды LcBit, LnBit и домен SmBit86. Два пептида люциферазы присоединяли к каждому из двух Ub. При их взаимодействии фрагменты люциферазы сближались и образовывали функциональный фермент, вырабатывающий люминесцентный сигнал при добавлении субстрата.

Сплит-системы адаптировали для выявления проксимальных Ub и анализировали формирование диубиквитиновых сигнатур в базовом состоянии и под действием эффекторов УПС в клетках HEK293T. Показано, что сплит-системы FAST и NanoLuc эффективно детектируют остатки Ub в комплексе с UBA1. В результате работы выявлено, что аминокислотный остаток Lys27 Ub важен для реакции транстиоэтерификации UBA1-E2 в клетках млекопитающих.

ИЗМЕРЕНИЕ НАНОМЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Ишманов Т.Ф.[1*], Шекунов Е.В.[1], Злодеева П.Д.[1], Анкудинов А.В.[1, 2]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Физико-технический институт имени А. Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: ishmanov@incras.ru*

Наномеханические свойства липидных бислоев, такие как жесткость и адгезия, играют ключевую роль в межмембранных взаимодействиях и функционировании встроенных в бислой белков (Watson, 2015). Эти параметры определяются длиной и насыщенностью ацильных цепей мембранообразующих липидов, а также химической структурой и зарядом их полярных групп. Целью настоящей работы являлась количественная оценка вклада указанных факторов в наномеханические свойства липидных бислоев методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) в гибридном режиме PeakForce QNM.

В ходе исследования модельных мембран было установлено, что сила адгезии зонда к бислою на твердой подложке не зависит от длины ацильной цепи насыщенных фосфатидилхолинов (~ 0.46 нН и ~ 0.49 нН), в то время как наличие двойной связи в цепи снижает этот параметр (~ 0.28 нН). Переход от нейтрального фосфатидилхолина к анионным липидам, фосфатидилсерину (~ 0.34 нН) или фосфатидилглицерину (~ 0.29 нН), сопровождается снижением адгезии независимо от наличия двойной связи в углеводородных цепях липидов.

Оценка жесткости бислоев выявила сходную зависимость от насыщенности и длины ацильных цепей, но продемонстрировала значимость типа полярной части анионного липида. Так, жесткость бислоя оказалась нечувствительна к замене холина на глицерин (~

0.21 Н/м и ~ 0.18 Н/м соответственно), но существенно снижалась при замене на серин (~ 0.06 Н/м). Это может быть связано как с размером химической группировки, присоединенной к фосфатной группе, так и с различиями в степени гидратации бислоев и плотности упаковки липидов в мембранах.

Таким образом, сопоставление независимых наномеханических характеристик показало, что сила адгезии зависит от насыщенности ацильных цепей и заряда липидов, а жесткость также чувствительна к типу анионного липида.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-74-00084).

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ И ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕЙРОСФЕР ИЗ ИПСК ЧЕЛОВЕКА С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ РАЗРАБОТКОЙ БИНАРНОГО КЛАССИФИКАТОРА

Копылова А.А.[1*], Шумилин Р.В. [1], Перепелица Е.С.[2], Благова А.В.[2], Волегова Д.А.[1], Зубова А.В.[2], Капкаева М.Р.[2], Симкин И.В.[1], Салмина А.Б. [1,2], Юрченко С.О. [1], Иллариошкин С.Н.[2]

1. *Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана, Москва, Россия*
2. *Институт мозга, Российский центр неврологии и нейронаук, Москва, Россия*

E-mail: annkplv@yandex.ru*

Трехмерные (3D) нейрональные культуры, такие как нейросферы, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК), представляют собой многообещающий инструмент для изучения межклеточных взаимодействий, воспроизведения механизмов нейродегенерации и моделирования заболеваний (Zheng et al., 2026). Целью данного исследования было

проведение сравнительного морфометрического и иммуноцитохимического анализа нейросфер и их конгломератов, полученных из ИПСК пациентов с болезнью Альцгеймера (БА), болезнью Паркинсона (БП) и здоровых доноров, и разработка бинарного классификатора для оценки полученных нейросфер.

ИПСК были получены из лейкоцитов периферической крови, перепрограммированы и дифференцированы в нейрональные предшественники, после чего были сформированы 3D-культуры — нейросферы. Иммуноцитохимическое профилирование продемонстрировало увеличение митохондриальных маркеров, снижение пролиферации и нейрональной дифференцировки в нейродегенерации в отличие от нормы. Помимо этого, были разработаны алгоритмы сегментации и классификации. С помощью сегментации были оценены 16 морфометрических параметров, где статистический анализ выявил групповые различия: нейросферы, полученные из БА и БП, оказались более круглыми, но с более нерегулярными границами. Конгломераты нейросфер БА были в целом меньше, что коррелировало со снижением пролиферации, показанным иммуноцитохимическим исследованием.

Оценка эффективности итоговых моделей классификатора подтвердила их высокую предсказательную способность: для классификации конгломератов, связанных с болезнью Альцгеймера, значение F1-меры составило 0.846; для классификации конгломератов, связанных с болезнью Паркинсона, значение F1-меры достигло 0.847.

Эти результаты показывают, что морфометрическое и иммуноцитохимическое профилирование, дополненное классификацией с помощью машинного обучения, имеет возможность обеспечить чувствительную платформу для обнаружения специфических для заболевания изменений в 3D-нейрональных культурах и поддерживает их использование в исследованиях нейродегенерации.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ на реализацию крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития (проект № 075-15-2024-638).

ВЛИЯНИЕ СТЕРИНОВ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АМФОТЕРИЦИНА Б С МЕМБРАНОЙ

Коровко А.Д.[1]*, Малыхина А.И.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: korovkoanna0@gmail.com*

Амфотерицин Б (АмБ) – полиеновый макролидный антибиотик. Его основной мишенью является эргостерин (ЭРГ) в составе мембран грибковых клеток, но в форме агрегатов АмБ способен повреждать и мембраны млекопитающих, содержащие холестерин (ХОЛ). Липосомальные формы АмБ не устраняют полностью токсичность препарата. В работе (S.S. Efimova, O.S. Ostroumova, 2024) показано, что эффективность и токсичность липосомальных форм зависит от их стеринового состава.

Целью работы являлось изучение взаимодействия АмБ с бислоями, содержащими различные стерины, и определение ключевых характеристик мембраны для создания эффективной липосомальной формы АмБ.

В работе использованы ЭРГ, ХОЛ, десмостерин (ДСТ), 7-дегидрохолестерин (7-ДХ), кампестерин (КАМП) и стигмастерин (СТИГМ). МД системы состояли из 1-пальмитолил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) и стерина в соотношении 2:1 (CHARMM36m, время симуляции составило 1 мкс). Одну молекулу АмБ помещали в центр бислоя.

Энергии электростатического ($E_{эл}$) и Ван-дер-Ваальсова ($E_{ВДВ}$) взаимодействия АмБ с мембраной усредняли по всей траектории. $E_{ВДВ}/E_{эл}$ (кДж/моль): СТИГМ -273±53/-159±80; КАМП -321±37/-

120±64; ДСТ -306±46/-159±71; ЭРГ -336±29/-132±59; ХОЛ -323±36/-161±68; 7-ДХ -319±35/-172±74. Во всех системах $E_{ВДВ}$ преобладала над $E_{эл.}$ При близкой $E_{общ}$ для ЭРГ и ХОЛ соотношение $E_{эл}$ и $E_{ВДВ}$ различалось. Среднее расстояние атома O11 (гидроксильной группы на конце макролактонного кольца) от центра бислоя (Å), содержащего соответствующий стерин, было равно: 7-ДХ 12±7; СТИГМ 11±6; ДСТ 10±7; ХОЛ 7±6; ЭРГ 5±4; КАМП 4±4. Наиболее глубоко АмБ располагался в мембранах с ЭРГ и КАМП, в бислоях с 7-ДХ и ДСТ антибиотик быстрее всего достигал границы бислой/вода. В СТИГМ-содержащих мембранах молекула АмБ флуктуировала между различными положениями.

Сопоставление полученных результатов и данных измерения утечки кальцеина из липидных везикул, имитирующих мембраны грибковых клеток (S.S. Efimova, O.S. Ostroumova, 2024), позволяет связывать эффективность действия АмБ-содержащих липосом с локализацией антибиотика ближе к поверхности бислоя и наименьшим вкладом Ван-дер-Ваальсовых сил в энергию взаимодействия АмБ с мембраной. Можно думать, что погружение антибиотика в гидрофобную область бислоя и высокая энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий с ацильными цепями липидов препятствуют его переносу на таргетную мембрану. Так, наиболее предпочтительным кандидатом для оптимизации стеринового состава полиен-нагруженных липосом может быть 7-ДХ, который показал максимальное высвобождение кальцеина за счет поверхностной локализации АмБ и относительно невысокого вклада ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Наименее предпочтительными кандидатами являются КАМП и ЭРГ, характеризующиеся наименьшими величинами утечки флуоресцентного маркера из таргетных везикул, расположением антибиотика ближе к центру бислоев и наибольшим вкладом $E_{ВДВ}$ в энергию взаимодействия АмБ с мембранами. Таким образом, предлагаемый молекулярно-динамический подход, может быть, с успехом использован для оптимизации липидного состава липосомальных форм полиеновых антибиотиков.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-14-00162)

РОЛЬ ЛИПИДНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В ПОРООБРАЗОВАНИИ α-СИНУКЛЕИНОМ

Мартынюк В.А.*[1], Чумин М.М.[1], Ефимова С.С.[1], Остроумова О.С.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

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

Болезнь Паркинсона – нейродегенеративная патология, основным маркером которой являются агрегаты белка α-синуклеина – тельца Леви. Физиологические функции данного белка в норме основаны на амфифильности его мономерных форм и часто ассоциированы с мембранами (Butler et.al., 2016). Тем не менее, роль взаимодействия агрегатов α-синуклеина с мембранами в патогенезе болезни Паркинсона до конца не понятна.

Целью данной работы являлось выявление особенностей взаимодействия α-синуклеина с липидными мембранами различного состава.

Регистрацию одиночных каналов, индуцированных α-синуклеином, осуществляли электрофизиологическим методом на плоских бислоях, сформированных по Монталу и Мюллеру (Montal and Mueller, 1972). Оценку изменения порообразующей способности белка проводили по изменению средненормированного тока (I_{sc}) и пороговой концентрации порообразования ($C_{n/o}$). Мембраны состояли из фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилглицерина (ФГ), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидной кислоты (ФК) или кардиолипина (КЛ). Оценку влияния белка на термотропное поведение липидов проводили с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии по температуре плавления липидов (ΔT_m).

Электрофизиологическим методом было показано, что I_{sc}, индуцированный α-синуклеином, зависит от состава мембраны и увеличивается в ряду ФХ<ФК<ФГ<ФС<КЛ (0, 8, 13, 39, 70 пА, соответственно), что, вероятно, связано с изменением плотности отрицательного заряда в данных системах. Обсуждается влияние эластических свойств на данный параметр. Также было отмечено изменение $C_{n/o}$ при варьировании состава мембран: ФК≈ФС≈КЛ<ФГ (0.15, 0.2, 0.2 и 0.53 мкМ, соответственно), что может быть связано с распределением плотности поверхностного заряда мембран.

Введение белка в мембраны, содержащие ФХ, в соотношении липид:белок 500:1 не приводило к значимым изменениям термотропных характеристик липидов. В ФК-содержащей системе α-синуклеин снижал температуру плавления мембранообразующих липидов (на 0.4°С), что говорит о разупорядочивающем действии белка в данной липидной системе. В системах, содержащих ФС, ФГ и КЛ, температура плавления увеличивалась (на 0.1, 0.1 и 0.6°С, соответственно), что говорит о конденсации данных мембран α-синуклеином.

РАСШИРЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,3,4-ДИТИАДИАЗОЛА КАК МОДУЛЯТОРОВ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

Новикова Ю.В.[1*], Куровский Е.Б.[1], Григорьева Е.Р.[1], Колесников Д.О.[1], Юсковец В.Н.[2], Чернов Н. М.[2], Яковлев И.П.[2], Вигонт В.А.[1], Казначеева Е В.[1], Грехнев Д.А.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: miyorene@yandex.ru*

Депо-управляемый вход кальция (store-operated calcium entry, SOCE) является ключевым механизмом поддержания кальциевого гомеостаза (Hogan et al., 2015). Нарушения этого пути выявлены при аутоиммунных, воспалительных, онкологических и нейродегенеративных заболеваниях (Kappel et al., 2019), что определяет актуальность поиска модуляторов SOCE. Ранее нами был описан новый класс ингибиторов SOCE – производные 1,2,3,4-дитиадиазола (Grekhnev et al., 2022; Novikova et al., 2024). Анализ структурных аналогов показал, что наиболее выраженная активность характерна для соединений с сильными электроноакцепторными заместителями в одном из бензольных колец. Однако наиболее активные представители также снижали содержание кальция в эндоплазматическом ретикулуме (ER), что указывало на ограниченную селективность их действия.

Целью настоящей работы было проведение структурной оптимизации наиболее эффективных производных 1,2,3,4-дитиадиазола для получения пула структурных аналогов, которые избирательно ингибируют SOCE, практически не влияя на содержание кальция в ER. В рамках структурной оптимизации в молекулы двух лидирующих соединений был введен дополнительный электроноакцепторный заместитель во второе

бензольное кольцо. Для оценки активности соединений использовали флуоресцентные кальциевые зонды Fluo-4AM и Fura-2AM, генетически кодируемый кальциевый сенсор ER, patch-clamp и конфокальную микроскопию.

Функциональный анализ показал, что новые производные сохраняют способность подавлять SOCE. При этом их влияние на кальциевый контент ER было значительно снижено по сравнению с исходными соединениями, что свидетельствует о повышении селективности в отношении депо-управляемых кальциевых каналов. Электрофизиологические эксперименты подтвердили ингибирование депо-управляемых кальциевых токов. Кроме того, методом конфокальной микроскопии показано подавление NFAT-зависимого сигнального пути: новые производные снижали транслокацию NFAT в ядро, активация которой инициируется SOCE.

Таким образом, среди производных 1,2,3,4-дитиадиазола выделены две функционально различающиеся группы: ингибиторы, одновременно подавляющие SOCE и уменьшающие содержание кальция в ER, и более селективные ингибиторы SOCE без значимого влияния на кальциевый контент ER. Полученные аналоги 1,2,3,4-дитиадиазольного скаффолда могут использоваться как молекулярные инструменты для исследования кальциевой сигнализации и основа для разработки новых фармакологических модуляторов SOCE.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-75-00103).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КУРКУМИНА СО ЗРЕЛЫМИ АМИЛОИДНЫМИ ФИБРИЛЛАМИ ЛИЗОЦИМА И ИНСУЛИНА

Павлюченко Е.Ю.[1,2*], Сулацкий М.И.[2], Степаненко Ольга В.[2], Степаненко Олеся В.[2], Михайлова Е.В.[2], Сулацкая А.И.[2]

1. *ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: pavlyuchenko.eyu@mail.ru*

Амилоидные фибриллы – это высокоупорядоченные белковые агрегаты, накопление которых связано с развитием нейродегенеративных заболеваний и системных амилоидозов. Благодаря устойчивой кросс-β-структуре фибриллы имеют высокую стабильность, в связи с чем поиск биосовместимых соединений, способных модифицировать зрелые амилоиды, является актуальной задачей. В качестве такого соединения может быть рассмотрен природный полифенол растительного происхождения куркумин, способный ингибировать фибриллогенез. Целью работы стало изучение взаимодействия куркумина с амилоидными фибриллами на основе лизоцима и инсулина.

После инкубирования амилоидов с куркумином свободный полифенол был удален из проб методом равновесного микродиализа. Сохранение в образцах характерной для полифенола полосы поглощения подтвердило его ассоциацию с фибриллами, а различия в амплитуде и форме зарегистрированных спектров свидетельствовали о неидентичном микроокружении куркумина, связанного с каждым из типов амилоидов.

С использованием метода просвечивающей электронной микроскопии показаны декластеризация и фрагментация обработанных куркумином амилоидов, причем выраженность изменений зависела от типа фибрилл. Уменьшение размеров

агрегатов также подтверждено заметным снижением рэлеевского светорассеяния образцов после взаимодействия с полифенолом.

Анализ спектров кругового дихроизма показал, что воздействие куркумина не вызывает выраженного разрушения вторичной структуры и, в частности, β-листов, фибрилл, что согласуется с сохранением их фибриллярной морфологии. Однако изменение собственной УФ-флуоресценции и анизотропии флуоресценции фибрилл свидетельствует о том, что действие куркумина приводит к локальным структурным преобразованиям, которые могут быть обусловлены изменением надмолекулярной организации агрегатов. С использованием МТТ-теста установлено, что такие преобразования не приводят к увеличению цитотоксичности амилоидов.

Таким образом, куркумин способен связываться со зрелыми амилоидами на основе инсулина и лизоцима, вызывая уменьшение размера кластеров, их разделение на отдельные волокна и фрагментацию фибрилл без увеличения цитотоксичности агрегатов. Полученные результаты позволяют рассматривать куркумин в качестве биосовместимого агента, способного повышать доступность стабильных фибриллярных кластеров для последующих антиамилоидных воздействий, в том числе со стороны ферментов иммунной системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 23-74-10092-П).

ВЫЯВЛЕНИЕ Ca^{2+}-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ И РЕАКЦИЙ, КОНТРОЛИРУЕМЫХ МЕХАНОУПРАВЛЯЕМЫМИ ИОННЫМИ КАНАЛАМИ PIEZO1 В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Руднева З.М.[1*], Сударикова А.В.[1], Князева В.Ю.[1], Чубинский-Надеждин В.И.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: khairyllinaa@mail.ru*

Механические сигналы микроокружения являются одними из наиболее сильных модуляторов физиологических реакций клеток различного происхождения. Среди клеточных механосенсоров особый интерес представляют механоуправляемые ионные каналы. Известно, что активность таких каналов, особенно тех, которые регулируют приток ионов Ca^{2+} – универсальных вторичных внутриклеточных посредников, – играет ключевую роль в управлении многими важными биологическими процессами, включая пролиферацию, миграцию и адгезию. Ионный канал Piezo1 является одним из ключевых механосенсоров в клетке. Piezo1 широко экспрессируется в различных тканях позвоночных и тонко управляет клеточным поведением. Мы показали, что ионный канал Piezo1 может действовать как модулятор, контролирующий поведение сфероидов эндометриальных мезенхимных стволовых/стромальных клеток: активация Piezo1 оказывает влияние как на процессы образования сфероидов, так и на диссеминацию клеток сфероидов. Также мы показали, что активация Piezo1 нарушает формирование сфероидов из агрессивной линии клеток меланомы SK-MEL-2. Таким образом, селективная модуляция активности Piezo1 может быть использована для повышения эффективности клеточной терапии, а также при разработке стратегий контроля поведения клеток. Возникает вопрос: какие физиологические пути зависят от активности Piezo1?

Важным примером присутствия множественных Ca^{2+}-зависимых сигнальных путей, одновременно контролируемых Piezo1, являются эритроциты. В частности, активация Piezo1 приводит к поступлению Ca^{2+} из внеклеточной среды в клетку, что, в свою очередь, активирует Ca^{2+}-активируемые K^{+}-каналы с промежуточной проводимостью (KCa3.1), Ca^{2+}-активируемые фосфолипидные скрамблазы ANO6 (TMEM16F) и паннексины-1 (Panx1) (Lew et al., 2025). Данные сигнальные пути имеют решающее значение для физиологии и патофизиологии эритроцитов. Мы установили сходства и различия в Ca^{2+}-зависимых регуляторных путях, индуцируемых каналами Piezo1 в эритроцитах и в линии предшественников эритроидных клеток человека K562, которая широко используется в качестве модели для изучения эритропоэза. В клетках K562 мы обнаружили функциональные связи между каналами Piezo1 и KCa3.1, а также между Piezo1 и ANO6, аналогичные тем, которые наблюдаются у эритроцитов. Однако, в отличие от эритроцитов, клетки K562 не имеют функциональной оси Piezo1–Panx1, что связано с неспособностью Panx1 активироваться Ca^{2+} в этой клеточной линии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 22-74-10037-П).

МИКРОФЛЮИДНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА «АНГИОГЕНЕЗ-НА-ЧИПЕ» ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ АНГИОГЕНЕЗА И ТЕСТИРОВАНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Салина К.О.[1*], Копылова А.А.[1], Кушнир И.А.[1], Драгун М.А.[1], Быстров Д.А.[1], Крючков Н.П.[1], Яковлев Е.В.[1], Юрченко С.О.[1]

1. Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана, Москва, Россия

E-mail: salina.k@bmstu.ru*

Одной из задач моделирования ангиогенеза *in vitro* является создание воспроизводимых условий для направленного роста клеток и контролируемого воздействия на них. В связи с этим разработка микрофлюидной тест-системы «ангиогенез-на-чипе», позволяющей воспроизводить ангиогенез в контролируемом трехмерном микроокружении, является актуальной задачей. В процессе разработки были изготовлены и исследованы несколько вариантов архитектуры микрофлюидных чипов, включая различные конфигурации каналов и барьеров, обеспечивающих взаимодействие гидрогелевого скаффолда и эндотелиальных клеток. Разработанная конструкция формирует область управляемого ангиогенеза размером 2 × 2 мм, а сам микрофлюидный чип совместим со светлопольной, флуоресцентной и конфокальной микроскопией и поддерживает жизнеспособность эндотелиальных клеток и фибробластов в течение не менее восьми суток. Платформа позволяет индуцировать ангиогенез с использованием факторов роста, кокультивированием с культурой фибробластов, а также исследовать влияние внешнего электрического поля. Конструкция чипа предусматривает интеграцию электродной системы, позволяющей управлять направлением вектора напряженности электрического поля в плоскости под углами 0°, ±45° и ±90°. Работа дополнена разработкой агентной модели ангиогенеза, воспроизводящей ключевые механизмы данного процесса.

Разработанная платформа может применяться для исследования клеточных механизмов ангиогенеза при биохимической и электрической стимуляции, что делает ее перспективной тест-системой для проверки и сравнительной оценки действия фармакологических соединений на инициацию ангиогенеза и спраутинг.

Исследование выполнено за счет бюджетного финансирования в рамках государственного задания «Управляемый ангиогенез: коллективная клеточная динамика и новые физические методы воздействия», № 0705-2025-0010, МГТУ имени Н.Э. Баумана.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Соловьёв Д.А.[1,2,3*], Полянина А.О.[1,4], Товпеко Д.В.[2], Александер-Синклер Э.И.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*
3. *ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны РФ, Санкт-Петербург, Россия*
4. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: whale203@mail.ru*

В последние десятилетия наблюдается стремительное развитие нанотехнологий. Данная область позволяет создавать объекты нанометрового масштаба (от 1 до 100 нм), а также объекты, превышающие этот диапазон по отдельным измерениям, но сохраняющие уникальные физико-химические свойства. К ним относятся углеродные нанообъекты (фуллерены и их производные, углеродные нанотрубки и нановолокна), органические

наноматериалы (липосомы, дендримеры, мицеллы) и неорганические наночастицы (золота, серебра, оксидов железа). Среди них наиболее изученными и широко применяемыми в современной медицине являются липосомы, а также фуллерены и их производные. Липосомы, представляющие собой везикулы с липидной бислойной мембраной, часто рассматривают как перспективную систему для адресной доставки диагностических или лекарственных средств, в том числе в экспериментальной онкологии. Фуллеренолы – гидроксилированные производные фуллеренов – в качестве антиоксиданта и сенсибилизатора при терапии онкопатологий. Несмотря на выраженные биологические свойства липосом и фуллеренолов, детальная оценка их цитотоксического и цитопротекторного потенциала остается актуальной научной задачей. Первичный скрининг биосовместимости проводят с использованием клеточных тест-систем *in vitro*, однако при работе с наноматериалами возникает ряд методических проблем, обусловленных их структурно-физико-химическими характеристиками. Наноразмерные объекты способны вносить существенные артефакты при количественной оценке цитотоксичности.

Целью исследования является проведение сравнительного анализа количественных методов оценки жизнеспособности дермальных фибробластов человека (МТТ-теста, резазурин-теста и окрашивания генцианвиолетом) при изучении цитотоксичности фуллеренолов и «пустых» липосом.

Результаты исследования показали, что при оценке цитотоксичности фуллеренолов метод окрашивания генцианвиолетом даёт ложноположительные результаты вследствие способности фуллеренолов образовывать белковую корону, которая неспецифически связывает краситель. При изучении цитотоксичности липосом методы окрашивания генцианвиолетом и МТТ-тест продемонстрировали противоречивые данные, что указывает на методические ограничения их применения для наноматериалов данного типа.

В результате исследования установлено, что наиболее корректным и воспроизводимым методом оценки цитотоксичности наноматериалов является резазурин-тест.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания № FMFU-2026-0012.

ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ИНКУБАЦИИ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ ЛИЗОЦИМА С АТФ НА ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К РАЗЛИЧНЫМ ДЕГРАДИРУЮЩИМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

Степаненко О.В.[1], Сулацкий М.И.[1*], Гридасова К.Ж.[1], Степаненко О.В.[1], Сулацкая А.И.[1]

1. *ФГБУН «Институт Цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: m_sulatsky@mail.ru*

Клеточное старение – фактор риска развития амилоидозов. Эти заболевания связаны с накоплением в организме высокоупорядоченных агрегатов белков, амилоидных фибрилл. Для данных патологий также характерно снижение выработки АТФ из-за митохондриальной дисфункции. Известно, что АТФ способен влиять на белковый гомеостаз, напрямую стабилизируя белки и опосредуя энергетическую поддержку молекулярных шаперонов. Кроме того, этот нуклеотид вовлечен в патогенез амилоидозов как на этапе формирования агрегатов, кинетически модулируя процесс, так и на поздних стадиях – он обнаруживается в составе амилоидных бляшек. Ранее мы показали, что амилоиды лизоцима способны связывать АТФ с микромолярной аффинностью и увеличением мест связывания нуклеотида по сравнению с нативным белком. Связывание АТФ приводило к декластеризации и уменьшению упорядоченности волокна амилоидов. АТФ-опосредованная ремодуляция фибрилл приводила к снижению их цитотоксичности и

устойчивости к химической и тепловой деградации. Дальнейшие исследования влияния амилоид-модулирующей способности АТФ на чувствительность амилоидов к деградирующим воздействиям другого типа существенны для понимания механизмов их клиренса в организме.

В качестве амилоид-деградирующих факторов в настоящей работе использовались протеолитические ферменты, матриксная металлопротеиназа-9 (MMP-9) и трипсин; белок с шаперонной активностью αB-кристаллин (αB-Cr); денатурант гуанидин гидрохлорид (GdnHCl). Влияние этих агентов на морфологию АТФ-модифицированных амилоидов было проанализировано с использованием метода просвечивающей электронной микроскопии. Оказалось, что инкубация амилоидов лизоцима с АТФ усиливала их деградацию под действием протеаз и денатуранта без изменения характерного механизма воздействия: разупорядочение в случае MMP-9, фрагментация и разупорядочение под действием трипсина и снижение плотности кластеров в присутствии GdnHCl. Воздействие αB-Cr на амилоиды лизоцима как с, так и без обработки АТФ, приводило к заметному снижению упорядоченности фибриллярного волокна с образованием крупных и рыхлых агрегатов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что АТФ и деградирующие агенты оказывают синергичное воздействие на амилоиды лизоцима. Таким образом, впервые показано, что АТФ-индуцированная декластеризация амилоидов способна повышать эффективность их деградации, что открывает новые возможности для разработки перспективных антиамилоидных стратегий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 23-74-10092-П).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЛЬТА-ПЕПТИДА ВИРУСА ЭБОЛА МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Хлыбов А.С.[1*], Малыхина А.И.[1], Ефимова С.С.[1], Остроумова О.С.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: ar.serik@outlook.com*

Продолжающиеся вспышки вируса Эбола и ограниченность методов лечения обуславливают необходимость поиска новых терапевтических мишеней. Возможным кандидатом является виропорин вируса Эбола, дельта-пептид, являющийся фактором вирулентности. Цель работы - изучение олигомерных состояний пор, формируемых этим пептидом в плазматической мембране, и анализ их липидного микроокружения.

Вторичная структура пептида была предсказана с использованием AlphaFold 3. Тетра-, пента-, гекса- и гептамерные модели поры были собраны симметрично с начальным диаметром 7 - 15 Å и с направленными внутрь положительно заряженными аминокислотами. Данные поры были помещены в липидные бислои (100 липидов в каждом монослое), имитирующие плазматическую мембрану и состоящие из диолеоилфосфатидилсерина (ДОФС), сфингомиелина и холестерина в отношении 50/20/30 (мол.%). Бислои были гидратированы 0.15 M NaCl. Анализ симуляций (1000 нс; 25 °C; CHARMM36m; GROMACS) включал определение кинетики радиуса пор (CHAP; считались открытыми при радиусе > 0.98 Å) и подсчет водородных связей между компонентами системы (VMD).

Средний минимальный радиус открытого состояния составил 1.4±0.8 Å, 3.1±2.1 Å, 2.7±1.8 Å и 3.85±2.2 Å для тетра-, пента-, гекса- и гептамера соответственно. Таким образом, увеличение порядка олигомеризации сопровождалось увеличением радиуса поры, за исключением гексамера. Среднее количество водородных связей

дельта-пептида с молекулами холестерина нормированное на число мономеров было 0.08±0.14, 0.15±0.16, 0.17±0.16, 0.09±0.11 для тетра-, пента-, гекса- и гептамера соответственно. В случае сфингомиелина соответствующие параметры равны 0.78±0.43, 0.80±0.42, 0.35±0.22 и 0.59±0.26. С ДОФС: 5.67±1.25, 5.07±0.97, 4.64±0.99 и 4.89±0.98. Пептид-пептидные взаимодействия характеризовались следующими величинами 2.92±1.16, 2.42±0.98, 3.55±1.06 и 2.58±0.88. Обращает на себя внимание усиление пептид-пептидного взаимодействия в гексамере. Замена сфингомиелина, характерного для липидного окружения тетра-, пента- и гептамера, на холестерин, окружающий гексамер, усиливает пептид-пептидное взаимодействие, что приводит к снижению радиуса поры.

Во всех случаях основным компонентом микроокружения пор являлся ДОФС, что указывает на его ключевую роль в процессе их стабилизации. Отрицательно заряженные головные группы ДОФС участвуют в формировании гидрофильных стенок канала, что также может обуславливать катионную селективность, характерную для большинства виропоринов (Griffin S.D. et al. 2003, Gan S. 2012).

МЕМБРАННАЯ АКТИВНОСТЬ С-ДОМЕНА АТЛАСТИНА

Шекунов Е.В.[1*], Кевер Л.В.[1], Ишманов Т.Ф.[1], Архипов А.В. [1], Ефимова С.С.[1], Остроумова О.С. [1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: egor_shekunov@mail.ru*

Мембранное слияние, опосредованное белком атластином (АТЛ), имеет фундаментальное значение для поддержания структуры эндоплазматического ретикулума (ЭР). Литературные данные свидетельствуют об участии в данном процессе С-домена АТЛ, вызывающего дестабилизацию бислия и, т.о., облегчающего слияние мембран ЭР, однако, точные молекулярные механизмы остаются изученными неполностью.

В рамках данной работы были проанализированы механизмы взаимодействия пептида $_{500}$-RELGAVIDQVAAALWD-$_{517}$ (АТЛ$_{500-517}$) соответствующего фрагменту С-домена первой изоформы человеческого атластина с мембранами, имитирующими ЭПР. Методом флуориметрии утечки кальцеина установлено, что при добавлении 20 мкМ АТЛ$_{500-517}$ утечка маркера из фосфотидилхолиновых (ФХ) везикул составляет около 65%. Замена части ФХ на холестерин (ХОЛ), церамид (ЦЕР) или фосфотидилэтаноламин (ФЭ) вызывает рост высвобождения маркера на 30%. Введение в состав нейтральных везикул фосфотидилсерина (ФС) ингибирует активность АТЛ500-517 до ≈ 35%. С применением метода дифференциальной сканирующей микрокалориметрии выявлено, что введение пептида вызывает дозозависимое изменение основных термотропных характеристик ФХ, ФЭ и ФС (Δ Tm: 0.3, 0.5, 0.7; ΔΔTb: 0, 0.1, 0.3; ΔHcal: -0.2, -4.5, -1.0, соответственно). Анализ электронных микрофотографий показал, что введение АТЛ500-517 вызывает изменение морфологии ФХ/ХОЛ везикул, а именно: четырехкратное увеличение линейных размеров везикул и формирование тубулярных выступов с индексом тубуляции ≈ 6%.

Совокупность полученных данных и наличие кластера из гидрофобных аминокислот в структуре ATL$_{500-517}$ позволяют предположить, что интеркаляция пептида в мембрану приводит к генерации отрицательной гауссовой кривизны и, как следствие, снижению энергетического барьера для слияния мембран.

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

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ДОСТАВКИ РНК ЛИПИДНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ

Шуйский Л.С.[1*], Чубарова А.В. [1], Шуйская С.В. [1], Скворцов И.А. [1], Решетников В.В. [1]

1. *АНОО ВО «Университет "Сириус», ФТ Сириус, Россия*

E-mail: shujskij.ls@talantiuspeh.ru*

Актуальной проблемой современных технологий РНК препаратов является создание и верификация адресных векторов – липидных наночастиц (ЛНЧ). ЛНЧ представляют собой стабильный комплекс, состоящий из различных липидов (в т.ч. ионизируемых) и РНК, погруженных внутрь, а на периферии находятся гидрофильные участки липидов. В качестве груза могут выступать матричные, самоаплифицирующиеся, короткие интерферирующие и другие типы РНК.

Таргетность доставки груза в клетки-мишени в условиях *in vitro* и *in vivo* может быть достигнута конъюгацией (например, фрагментом антитела), или модификацией липидного состава. Для доказательства адресной доставки ЛНЧ с грузом чаще всего используют: мечение флуорофором липида и/или РНК; а также детектирование флуоресценции кодируемого белка. Однако, неразрешенным фундаментальным вопросом остается исследование механизма интернализации ЛНЧ при таргетной доставке груза.

В рамках данного исследования была разработана и охарактеризована ЛНЧ-платформа для верификации адресной доставки и исследования механизма интернализации. Исходная композиция ЛНЧ содержит: холестерин; ионизируемые липиды SM-102 и ALC-0315; DSPC; DMG-PEG2000. Особенностью новой ЛНЧ является замена липида DMG-PEG2000 на липид – DSPE-PEG2000-Mal, через малеимидный фрагмент которого происходит конъюгация для таргетной доставки. В качестве метки использовали краситель – синий Эванса, флуоресценция которого разгорается при связывании с белками, или липидами.

Анализ физико-химических параметров ЛНЧ показал, что дзета-потенциал новой ЛНЧ составил -22,6 мВ (у исходного состава -5,191 мВ); а размер и полидисперсность двух типов ЛНЧ находятся в близких диапазонах. Дальнейшее исследование показало, что варьирование липидного состава меняет сродство к образованию альбуминовой «короны» на поверхности ЛНЧ.

Результаты, полученные с помощью прижизненной лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, показали, что новая ЛНЧ имеет сниженное сродство к мембранам клеток – это делает её перспективной для адресного нацеливания за счёт конъюгации с различными молекулами.

Для моделирования поведения ЛНЧ в кровотоке в условиях *in vitro* была создана и верифицирована новая микрофлюидная система, которая в дальнейшем позволит адекватно транслировать полученные экспериментальные данные на *in vivo* модели.

Исследование выполнено при поддержке гранта государственной программы федерального округа «Сириус»: «Научно-технологическое развитие федерального округа «Сириус» (Соглашение № 3-03 от 18 февраля 2025 г.).

НАПРАВЛЕННЫЙ ДИЗАЙН И ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ПРОИЗВОДНЫХ 3Н-КСАНТЕН-3-ОНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ХИТИНАЗ *OSTRINIA FURNACALIS*

Яковец П.С.[1,2*], Фролова Н.С.[1]

1. *Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Минск, Беларусь*
2. *Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

E-mail: yakov.polina.42@gmail.com*

Хитиназы насекомых – перспективные мишени для дизайна биорациональных инсектицидов. Они катализируют деградацию хитина при линьке и метаморфозе, обеспечивая развитие насекомого. Ингибирование их активности нарушает цикл линьки вредителя. Интерес для дизайна ингибиторов представляют гидрофобные кислородсодержащие гетероциклы, способные связываться в активном центре за счет геометрического соответствия и наличия фрагментов для π-π стекинга.

Цель работы: виртуальный скрининг трех производных 3Н-ксантен-3-она против структур хитиназ *O. furnacalis*.

Изучены лиганды: resbenz (6-гидрокси-9-фенил-3Н-ксантен-3-он), resvan (6-гидрокси-9-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-3Н-ксантен-3-он) и resnaf (6-гидрокси-9-(нафталин-1-илметил)-3Н-ксантен-3-он). Скрининг выполняли против 31 PDB-структуры хитиназ *O. furnacalis* с помощью AutoDock Vina (цепь A, бокс 5×5×5 нм).

Соединения демонстрируют выраженное сродство с низкими расчётными энергиями связывания $E_{св}$ (ккал/моль). Лиганд resnaf показал $E_{св}$ –8.1…–11.8. Наиболее аффинная интеракция выявлена с OfChtI (PDB: 3w4r, $E_{св}$ –11.8) в субстрат-связывающей щели (GLU148, PHE61, TRP107), а для OfChi-h (PDB: 6jmn) $E_{св}$ составила –11.7 (ARG439, TRP268, TRP389, TYR411). Со структурами OfChtII (PDB: 5y29, 6jax, 6jaw, 6jav) получен комплекс с $E_{св}$ –11.7...–11.6 в активном центре вблизи каталитических GLU1733 и ASP1731.

Лиганд resbenz показал $E_{св}$ –7.1…–11.8. Наибольшее сродство обнаружено к OfChi-h (PDB: 6jmn, $E_{св}$ –11.8) с ориентацией к ARG439, TYR411 и каталитическому GLU308, а к OfChtII (PDB: 6jaw) $E_{св}$ составила –11.6 за счет π-π стекинга ксантенового фрагмента с TRP1691 и TRP1809 вблизи каталитического GLU1733. Лиганд resvan показал диапазон $E_{св}$ –7.1…–11.6, связываясь в активном центре OfChi-h (PDB: 6jmn, 5gpr, 5gqb) с $E_{св}$ –11.6...–10.2 и ориентацией к каталитическому GLU308. Также высокая аффинность ($E_{св}$ –10.0...–9.8) отмечена к структурам OfChtII (PDB: 6jaw, 6jax, 5y29) с локализацией в активном центре за счет контактов с GLU1733, ASP1804 и ароматической платформой.

Моделирование *in silico* демонстрирует высокую аффинность связывания трех производных 3H-ксантен-3-она с хитиназами *O. furnacalis* с ориентацией в активном центре. Данные соединения представляют интерес для последующего тестирования *in vitro* на предмет способности выступать ингибиторами хитиназ или молекулярными зондами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ (проект № 20261794) и гранта Министерства Образования РБ (проект № 20261474).

Микробиология и протистология

ОЧИСТКА БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА, АССОЦИИРОВАННОГО С EPI-ВЕЗИКУЛОЙ БАКТЕРИОФАГА PHIKZ

Арисон В.А.[1*], Антонова Д.А[1]

1. ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: v.arison@icloud.com*

Инфекция бактериофагом phiKZ клеток *Pseudomonas aeruginosa* сопровождается появлением уникальных структур, а именно формированием фагового ядра (Danilova et al., 2020) — белковой сферической структуры, в которой происходит репликация и транскрипция фагового генома, и предшествующей ему EPI-везикулы (early phage infection vesicle) — мембранного пузырька, содержащего ДНК фага и вирионную РНК-полимеразу для транскрипции ранних генов (Antonova et al., 2024). EPI-везикула была выявлена недавно, и ее белковый состав неизвестен.

Цель данной работы — изучение состава везикулы и механизмов взаимодействия с клеточными белками.

Для получения EPI-везикул и крупных белковых комплексов клетки *P. aeruginosa* штамма PAO1 заражали фагом phiKZ, центрифугировали при 10000 g 5 мин при 4 °C через 10 минут инфекции. В качестве контроля использовались неинфицированные клетки. Лизис осадков проводили 4 циклами замораживания и оттаивания по 15 мин и инкубацией в течение 10 мин в буфере (20 мМ Tris-HCl pH 8,0, 0,1 мМ EDTA, 1 мг/мл лизоцим) из расчета 10 мл буфера на 1 грамм осадка, затем центрифугировали при 10000 g 10 мин. Супернатант концентрировали на белковом центрифужном фильтре (размер пор 100 кДа) с заменой буфера (50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl).

Разделение в градиенте сахарозы при ультрацентрифугировании (110000 g, 1.5 ч) позволило выделить фракцию, соответствующую положению полосы, отсутствующей в контрольном образце, для анализа методом ДСН-ПААГ. На геле в контрольной фракции

наблюдались лишь слабые полосы, тогда как в фракции из инфицированного лизата выявлен ряд специфичных и интенсивных полос.

Масс-спектрометрический анализ белков из этих полос ПААГ выявил шаперонин GroEL, компоненты пируват- и 2-оксоглутаратдегидрогеназных комплексов (E1, E2), α/β/β'-субъединицы бактериальной РНК-полимеразы, порин внешней мембраны OprF, структурные белки большой и малой субъединицы рибосомы uL2 и uS2, фактор элонгации Tu, а также фаговые белки Gp260 и Gp122.

Ранее для родственного phiKZ фага Goslar электронная микроскопия показала полисомы вблизи EPI-везикулы (Armbruster et al, 2025). Вероятно, обнаруженные в данном исследовании белки входят в состав крупного комплекса, участвующего в трансляции фаговых белков и синтезе АТФ, необходимого для развития фаговой инфекции, и, возможно, ассоциированного с EPI-везикулой.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-24-00477).

АВТОМАТИЗАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО МИКРОСКОПИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МИКРОСПОРОДИОЗОВ НАСЕКОМЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЬЮТЕРНОГО ЗРЕНИЯ И НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

Байазыт К.Д.К[1*], Ермаков Т. С.[2], Игнатьева А. Н.[1], В. В. Долгих[1], Платонов А. В.[2]

1. *Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: kamilcan@yandex.ru*

Микроспородиозы полезных насекомых представляют серьезную угрозу для сельского хозяйства. Отсутствие эффективных методов борьбы с этими патогенами требует поиска и разработки новых стратегий лечения данных заболеваний. Для оценки эффективности паразитарной нагрузки на хозяина, вызванной микроспоридиями, требуется их количественная оценка. Использование традиционного метода подсчета спор с помощью камеры Горяева сопряжено с длительной пробоподготовкой и возникновением ошибок из-за нарастающей утомляемости исследователя и при разведении проб. Существуют решения для анализа микрообъектов на основе алгоритмов компьютерного зрения. Применение стандартных подходов оказывается крайне неустойчивым к визуальному шуму и высокой концентрация спор в поле зрения, а также наличию кластеров микрообъектов и других факторов. Актуальные методы глубокого обучения и сверточных нейросетей (CNN) позволяют повысить качество анализа микроизображений в широком спектре задач. Благодаря универсальности и масштабируемости таких подходов открывается возможность внедрения высокопроизводительных архитектур, позволяющую не только разработать модель детекции, устойчивую к шумной среде и

высокой плотности объектов, но и обеспечивающую адаптацию программного обеспечения (ПО) под другие объекты.

Для разработки ПО подсчета спор микроспоридий нами применена одноклассовая модель YOLO версий 11 nano, small (s) и 26s, дообученная на размеченном наборе микроскопических изображений. Для обучения программы были взяты споры *Vairimorpha ceranae*, полученные из гомогенизированных искусственно зараженных кишечников медоносных пчел *Apis mellifera*. Произведена сравнительная оценка точности ПО и традиционного ручного подсчета титра спор, которая показала высокую точность и устойчивость к шумной среде полученного нейросетевого детектора. Обобщающая способность модели была успешно подтверждена на примере морфологически разных видов спор микроспоридий. Оценено влияние серийных кратных разведений проб (в 2, 4, 8, 16 и 20 раз), которое показало, что в очищенной суспензии спор рост ошибки зависит от выбранного объема аликвоты, в то время как в исходном гомогенате она растет экспоненциально. Разработанное ПО позволяет получать статистически обработанные данные для аннотирования результатов исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 23-16-00247).

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ-АССОЦИАНТОВ ЦЕНТРОХЕЛИДНЫХ СОЛНЕЧНИКОВ ИЗ ПОЧВЕННЫХ БИОТОПОВ

Балкин А.С.[1,2*], Пошвина Д.В.[1], Созонов Г.А.[1], Катаев В.Я.[2], Герасимова Е.А.[1]

1. *Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия*
2. *Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия*

E-mail: freelivingresearcher@gmail.com*

Протисты — наиболее многочисленная и эволюционно разнообразная группа эукариот. Они играют важнейшую роль в микробиологической пищевой цепи, питаясь бактериями и другими микроорганизмами, тем самым способствуя переработке органики и реминерализации питательных веществ. В природных экосистемах протисты и прокариоты формируют устойчивые связи. Их взаимоотношения могут варьировать от факультативных ассоциаций до тонко настроенных облигатных систем, сформированных в ходе длительной коэволюции, в результате которых формируются симбиозы, варьирующие по характеру от мутуализма до паразитизма. Однако, на сегодняшний день идентифицирована лишь небольшая часть этих симбионтов, в то время как структура и состав всех симбиотических бактериальных сообществ все еще остаются в значительной степени неизвестными. Примером недостаточно изученных систем служат ассоциации бактерий и центрохелидных солнечников. Центрохелидные солнечники представляют собой монофилетическую группу свободноживущих, повсеместно распространенных хищных протистов, обитающих в водных и почвенных биотопах. Несмотря на известные взаимодействия представителей группы с водорослями и клептопластию, бактериальные ассоциации остаются в значительной степени неизученными.

В работе проведена таксономическая и функциональная характеристика бактериальных геномов, полученных в результате высокопроизводительного секвенирования метагеномов трех изолятов центрохелидных солнечников, выделенных из почвенных биотопов. По результатам анализа метагеномов идентифицированы тринадцать бактериальных геномов (MAG), непосредственно ассоциированных с центрохелидными солнечниками, в том числе известные эндосимбионты эукариот (*Megaera polyxenophila*), а также потенциально новые таксоны бактерий в пределах отрядов *Burkholderiales*, *Sphingomonadales* и филогенетической клады UBA6186.

Подавляющее большинство геномов принадлежало к типу *Pseudomonadota*, один MAG был идентифицирован как представитель типа *Verrucomicrobiota*. На уровне класса наиболее распространенными оказались представители гамма- и альфа-протеобактерий. Реконструкция метаболических путей выявила различные пути метаболизма углеводов у бактерий, ассоциированных с солнечниками. В большинстве анализируемых геномов выявлены гены, кодирующие ферменты метаболизма гликолиза, цикла трикарбоновых кислот, а также компоненты жгутикового аппарата, хемотаксиса и систем секреции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-74-10031).

НОВЫЙ ДВУХЭТАПНЫЙ МЕТОД ОБОГАЩЕНИЯ ДНК *COXIELLA BURNETII* ДЛЯ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Безручко М.В.[1*], Полев Д.Е. [1], Фрейлихман О.А. [1]

1. *Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: felantalion@gmail.com*

Coxiella burnetii — грамотрицательная внутриклеточная бактерия, возбудитель лихорадки Ку (Q fever), она не растёт на стандартных питательных средах, что не позволяет получить чистую культуру бактерии. Особую сложность представляет полногеномное секвенирование *C. burnetii* из клинических образцов и образцов из внешней среды. Низкое содержание бактериальной ДНК (менее 1%) на фоне доминирующей эукариотической ДНК хозяина существенно ограничивает эффективность стандартных протоколов секвенирования. Это затрудняет сборку и филогенетический анализ, что в свою очередь сдерживает развитие молекулярной эпидемиологии и создание эффективных систем мониторинга циркуляции штаммов.

В работе использовали препараты ДНК (N=6), в которых ранее в рамках мониторинга лихорадки Ку на эндемичных территориях Российской Федерации была обнаружена ДНК *Coxiella burnetii* методом ПЦР-РВ с применением набора реагентов «Ампли-Сенс *Coxiella burnetii* FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Данные препараты ДНК были приготовлены с помощью набора реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) из промывной жидкости шерсти овец.

К каждому образцу был применён экспериментальный метод последовательного двустадийного обогащения ДНК, включавший селективную полногеномную амплификацию (SWGA) исходного препарата, приготовление библиотек ДНК для NGS и гибридизацию библиотек со специфичными ДНК-зондами, приготовленными из

геномной ДНК *C. burnetii*. Подготовку библиотек осуществляли с использованием набора NadPrep EZ DNA Library Preparation Kit v2 (Nanodigmbio, Китай). Для гибридизации использовали набор SeqCap EZ HyperCap (Roche, Швейцария). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina, США) в парноконцевом режиме с длиной прочтений 250 нуклеотидов. По результатам секвенирования проводили биоинформатический анализ с использованием программ: Trim_galore!, BWA, Mosdepth, SPAdes, PGAP, Quast, CheckM.

В результате применение метода последовательного обогащения ДНК позволило получить геномные сборки с полнотой от 45 % до 100 %, при этом доля генома с покрытием >30× составляет от 35 % до 97 %. Среднее нуклеотидное сходство (ANI) сборок с референсной последовательностью генома *Coxiella burnetii* составило более 95%, что подтверждает принадлежность полученных образцов к данному виду. Данные показатели обеспечивают возможность проведения высокоинформативного филогенетического анализа и молекулярно-эпидемиологических исследований.

НОВЫЕ БЕЛКОВЫЕ ПАРТНЕРЫ И ОСОБЕННОСТИ АТФАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА MUKBEF *E. COLI*

Белевич Я.В.[1*], Журавель К.Е.[1], Румянцева Н.А.[1], Сапожникова А.П.[1], Кудрявцева М.А.[1], Запрягаева Е.Ю.[1], Ведяйкин А.Д.[1]

1. ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: belevitch.yan@gmail.com*

Белковые комплексы SMC (Structural maintenance of chromosomes) являются важными компонентами систем компактизации ДНК, вероятно, у всех видов живых организмов. Они активно изменяют пространственную структуру ДНК посредством АТФ-зависимого механизма экструзии петель. Образование многочисленных петель значительно уменьшает объем, занимаемый хромосомой в клетке, и способствует правильной сегрегации хромосом при делении. У *E. coli* имеется SMC-подобный белковый комплекс MukBEF. Он состоит из V-образного гомодимера MukB, содержащего домены АТФазы ABC-типа, клейзина MukF, замыкающего кольцевую структуру комплекса, и белка MukE, выполняющего регуляторную функцию.

В данной работе были идентифицированы белковые партнеры MukBEF, а также охарактеризована АТФазная активность комплекса и показано влияние MukE и MukF на гидролиз АТФ белком MukB. Для этого белки комплекса MukBEF были выделены методами хроматографии. Характеризация АТФазной активности комплекса осуществлялась методом измерения концентрации свободных фосфатов малахитовым зеленым красителем. Измерение концентрации свободных фосфатов образцов с разными комбинациями белков комплекса MukBEF до и после инкубации позволило вычислить скорость гидролиза АТФ. Для обнаружения белков-партнеров MukBEF использовался метод соосаждения белков *in vitro* с использованием формальдегида в качестве фиксатора межбелковых взаимодействий. Верификация

обнаруженных взаимодействий проводилась с помощью бактериальной двугибридной системы *in vivo*. Метод основан на том, что при взаимодействии рекомбинантных белков, содержащих фрагменты флуоресцентного белка, происходит сборка полноценного флуоресцентного белка, что приводит к появлению флуоресценции.

Методом со-осаждения были впервые обнаружены взаимодействия комплекса MukBEF с цитратсинтазой (GltA) и факторами элонгации трансляции EF-Tu (TufA) и EF-G (FusA). С помощью бактериальной двугибридной системы были получены данные, указывающие на наиболее вероятное взаимодействие MukBEF с факторами элонгации трансляции EF-Tu и EF-G. Также было показано, что белки MukE и/или MukF стимулируют АТФазную активность MukB, а наибольшая АТФазная активность наблюдается у полного комплекса MukBEF, она составила 1,6 молекул АТФ в минуту на димер MukB.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-74-10022).

ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЭНДОБИОНТНЫХ ИНФУЗОРИЙ ИЗ СЕМЕЙСТВ SPIRODINIIDAE, CYCLOPOSTHIIDAE И OPHRYOSCOLECIDAE (LITOSTOMATEA, TRICHOSTOMATIA)

Белоконь М. Е.[1]*, Чистякова Л. В.[1], Корнилова О. А.[2]

1. *Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия*
2. *Российский государственный педагогический университет имени А. И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail**: belokon.me@gmail.com

Инфузории-трихостоматиды — облигатные эндобионты пищеварительного тракта позвоночных животных. В связи с высокой фенотипической пластичностью эндобионтных инфузорий

в литературе уже более века ведутся дискуссии о целесообразности использования отдельных морфологических признаков при выделении таксонов различного уровня в пределах данной группы протистов. Использование молекулярно-филогенетического анализа позволило существенно скорректировать представления о видовом разнообразии трихостоматид. В связи с этим интерес представляет изучение внутривидовой изменчивости инфузорий-эндобионтов с использованием разнообразных генетических маркеров, а также тестирование значимости различных молекулярно-генетических признаков для целей таксономии. В настоящей работе мы попытались оценить уровень внутривидовых различий отдельных представителей семейств Spirodiniidae, Cycloposthiidae и Ophryoscolecidae на основании анализа последовательностей гена 18S рРНК и региона ITS с использованием различных методов и подходов. В работе использованы изоляты следующих видов: *Tripalmaria dogieli* (сем. Spirodiniidae), *Cycloposthium edentatum* и *C. scutigerum* (сем. Cycloposthiidae), выделенные из проб фекалий различных, в том числе аборигенных, пород домашних лошадей из Беларуси, Якутии и европейской части России. Кроме того, в анализ были включены изоляты видов *Diplodinium, Epidinium, Eremoplastron, Eudiplodinium, Isotricha, Ophryoscolex, Polyplastron* (сем. Ophryoscolecidae) из рубца различных видов жвачных: крупного рогатого скота (Вологда, Якутия), оленей (Дальний Восток), лосей (Якутия, Ленинградская область, Дальний Восток) и снежных баранов (Якутия). По крайней мере в некоторых случаях выявлены группы изолятов в связи с систематической принадлежностью и регионом обитания хозяина. Так, например, анализ выровненных последовательностей и филотипической структуры изолятов инфузорий-эндобионтов кишечника лошадей выявил ряд филотипов, разделяемых хозяевами из географически удалённых точек отбора проб (Якутия, Мезень, Беларусь), что может свидетельствовать об ограниченной географической структурированности популяций на уровне разрешения использованных маркеров. Для некоторых видов офриосколецид

показано, что изоляты, выделенные из разных видов животных-хозяев, образуют отдельные клады на филогенетическом древе.

Работа выполнена при финансовой поддержке темы государственного задания 125012800903–5 (Зоологический институт РАН).

ОПТИМИЗАЦИЯ ПОРОГА ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДЛЯ РОДА *PARAMOEBA* НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ГЕНА 18S рРНК

Волкова Е.Н.[1*]

1. ФГБУН «Зоологический институт РАН», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: Ekaterina.Volkova@zin.ru*

Молекулярно-генетические методы играют ключевую роль в таксономических исследованиях, особенно для организмов с ограниченным числом морфологических признаков. Род *Paramoeba* (Amoebozoa) включает 5 видов, в дополнение к которым нами было изолировано четыре штамма. Надежные критерии видовой идентификации на основе молекулярных данных для этой группы до настоящего времени отсутствовали. Целью работы являлась разработка оптимального порога разделения внутри- и межвидовых генетических дистанций для рода *Paramoeba* на основе анализа гена 18S рРНК.

Для 23 штаммов *Paramoeba* были получены последовательности гена 18S рРНК. Методом UPGMA проведена кластеризация, выделено 5 кластеров, соответствующих видовой структуре рода. Для каждого кластера рассчитаны внутри- и межкластерные дистанции с использованием модели Тамуры-Неи. Оценку оптимального порога проводили методами ROC-анализа, баркод-гэп и минимизации ошибок. Была выявлена зона перекрытия распределений внутри- и межкластерных дистанций в интервале

0,0267–0,0365. Сравнение методов определения оптимального порога показало, что метод Юдена обеспечивает наилучший баланс между чувствительностью (Se) и специфичностью (Sp). Для полной выборки оптимальный порог составил 0,03246 с Se 93,9%, Sp 95,8% и общую точность 94,5% (F1 = 0,9605). При исключении дивергентных таксонов, *P. atlantica* и штамм V016, порог снизился до 0,02947, что повысило Se до 98,6%, но повлекло снижение Sp до 90,3%. Метод минимизации ошибок (порог = 0,02888) показал более высокую Se (99,5%), но сопровождался снижением Sp до 88,9%. Баркод-гэп продемонстрировал высокую Se (96,1%), однако уступил методу Юдена по балансу Se и Sp. При пересчете на скорректированном наборе данных метод Юдена сохранил оптимальный порог 0,03246, что подтверждает его робастность. Таким образом, метод Юдена является наиболее эффективным для видовой идентификации *Paramoeba* по гену 18S рРНК. Для полной выборки, включающей дивергентные таксоны, рекомендуется порог 0,03246. При работе с близкородственными видами предпочтительным является более низкий порог 0,02947, обеспечивающий более высокую Se. Дистанции, меньшие соответствующего порога, классифицируются как внутривидовые, дистанции, превышающие порог, — как межвидовые. Полученные результаты могут быть использованы для разработки молекулярно-генетических методов диагностики видов рода *Paramoeba*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-14-00278) с использованием оборудования ЦКП «Таксон» ЗИН РАН.

ПЕРВЫЙ СЛУЧАЙ ОБНАРУЖЕНИЯ ТРИПАНОСОМ КЛАДЫ «*TRYPANOSOMA THEILERI*» В КРОВИ ЛОСЕЙ *ALCES ALCES* ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Ганюкова А.И.[1*], Белоконь М.Е.[1], Седихин Н.В[1]

1. *ФГБУН «Зоологический институт РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: anna.ganyukova@gmail.com*

Трипаносомы клады «*Trypanosoma theileri*» являются всесветно распространёнными паразитами копытных животных. Клада объединяет генетически близкие виды жгутиконосцев, векторами которых выступают кровососущие беспозвоночные животные: гнус, слепни, кровососки, иксодовые клещи. Традиционное представление о слабой патогенности данных паразитов сегодня пересматривается. Накапливающиеся данные доказывают, что они способны вызывать гибель плодов и новорожденного молодняка. У взрослого крупного рогатого скота инвазия ассоциирована с анемией, лихорадочными состояниями, патологиями спинномозговой жидкости и падением удоев.

Предыдущие исследования, проведенные на северо-западе России и в Республике Саха (Якутия), выявили присутствие трипаносом клады «*Trypanosoma theileri*» у слепней и комаров, а также в крови клинически здорового крупного рогатого скота. Материалом для настоящего исследования послужили образцы крови и тканей (печени и селезенки) двух самцов европейского лося (*Alces alces*), добытых в октябре — ноябре в Лужском районе Ленинградской области. Анализ на наличие трипаносом проводили методом вложенной ПЦР с использованием специфичных праймеров. Во всех исследованных пробах была обнаружена ДНК паразита. Полученные нуклеотидные последовательности длиной около 700 п.н. показали 100%-ную идентичность изолятам из Ленинградской области, ранее депонированным в базу данных GenBank. Настоящая работа представляет собой первое свидетельство заражения диких

копытных животных кровепаразитами клады «*T. theileri*» на территории России.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-74-10071), Государственных заданий № 125012800903-5 и № 125012800908-0 на оборудовании ЦКП «Таксон» ЗИН РАН (Санкт-Петербург, Россия).

РЕЗЕРВУАРНАЯ РОЛЬ ЦЕНТРОХЕЛИДНЫХ СОЛНЕЧНИКОВ (CENTROPLASTHELIDA) ДЛЯ ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Герасимова Е.А.[1*], Пошвина Д.В.[1], Балкин А.С.[1, 2], Созонов Г.А.[1], Щербина В.С. [1]

1. *Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия*
1. *Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия*

E-mail: ea-ermolenko@yandex.ru*

Центрохелидные солнечники (Centroplasthelida) — монофилетический таксон одноклеточных свободноживущих хищных безжгутиковых протистов. Солнечники характеризуются глобальным распространением и населяют пресноводные, морские, гиперсоленые и почвенные биотопы. Центрохелиды известны как фаготрофные протисты, которые питаются жгутиконосцами, инфузориями, водорослями, мелкими многоклеточными или бактериями. Для ряда видов описана способность к формированию симбиотических ассоциаций с водорослями и клептопластия. Также описаны случаи экто- и эндосимбиоза с неизвестными таксонами бактерий.

Симбиотические взаимоотношения широко распространены между протистами, одноклеточными водорослями и бактериями. В ходе эволюции бактерии и водоросли сформировали широкий спектр

адаптивных стратегий, направленных на выживание в условиях давления со стороны хищных протистов. Внутриклеточные симбионты, фагоцитированные клеткой-хозяином, способны избегать лизосомальную деградацию, что приводит к установлению ассоциаций различной степени интеграции.

Симбиотические взаимоотношения описаны для большинства основных супергрупп эукариот и наиболее детально охарактеризованы у амеб и инфузорий. Мутуалистические ассоциации могут обеспечивать хозяину преимущества за счет биосинтеза метаболитов и продукции энергии, что позволяет протистам успешно существовать или доминировать в определенных экологических нишах. С другой стороны, протисты могут выполнять функцию «троянских коней», выступая в качестве природных резервуаров, обеспечивающих длительную персистенцию бактерий и сохранение их вирулентных свойств. В последние годы появляется все больше данных о персистировании патогенных для человека и животных микроорганизмов в микробиомах протистов.

В работе проведен анализ микробиомов солнечников из пресноводных и солоноватых водоемов и оценена резервуарная роль для патогенных и условно-патогенных бактерий. Микробиомы клональных культур солнечников изучены в трех биологических повторностях методом высокопроизводительного секвенирования ампликонов полного гена 16S рРНК на платформе PacBio. Таксономический анализ выявил в микробиомах анализируемых культур представителей родов *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Anaerococcus*, *Bosea*, *Corynebacterium*, *Cronobacter*, *Cutibacterium*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Prevotella*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Shigella* и *Sphingomonas*, среди которых выявлены патогены млекопитающих.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-74-10031).

НОВЫЙ ВИД АМЕБ РОДА *LEPTOMYXA* (AMOEBOZOA, TUBULINEA, LEPTOMYXIDA) С КОЛЬСКОГО ПОЛУОСТРОВА

Дуреев М.В.[1*], Кулишкин Н.С. [1], Смирнов А.В. [1]

1. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Биологический факультет, кафедра Зоологии беспозвоночных, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: st128419@student.spbu.ru*

Род *Leptomyxa* был установлен Т. Гудеем в 1915 году. Он относится к отряду Leptomyxida, семейству Leptomyxidae. По общему типу организации клетки выделяют компактных и сетчатых лептомикс. Компактные виды способны варьировать форму тела клетки от уплощенной и разветвленной до моноподиальной. Сетчатые лептомиксы это относительно крупные, уплощенные и сильноразветвленные организмы, которые крайне редко принимают моноподиальную форму. Их псевдоподии способны анастомозировать с образованием так называемых “фенестр” — незаполненных пространств в границах разветвленного тела клетки (Goodey, 1915). Представители амеб рода *Leptomyxa* распространены в пресноводных и почвенных местообитаниях.

В этом исследовании мы изолировали амеб штамма Varz24.1 из образца мха, собранного в сельском поселении Варзуга, Мурманская область, и изучили их с использованием светомикроскопических и молекулярных методов.

Амебы штамма Varz24.1 уплощенные и слаборазветвленные. По общему типу организации клетки их можно классифицировать в компактную группу лептомикс. При быстром передвижении они принимают моноподиальную форму с небольшой гиалиновой шапочкой. В чашках Петри, заполненных жидкой средой, мы наблюдали одиночные клетки, в то время как на поверхности агаризованной среды амебы часто формировали кластеры. В культурах амебы образовывали цисты после двух недель культивирования. Наиболее часто встречались одноядерные цисты,

однако мы наблюдали и более крупные многоядерные цисты, содержащие до семи ядер. На агаризованных средах цисты чаще всего были расположены кластерами. Для амеб штамма Varz24.1 мы получили последовательность гена 18S рРНК. На филогенетическом дереве отряда Leptomyxida этот сиквенс сформировал отдельную ветвь в составе клады рода *Leptomyxa*. Совокупность светомикроскопических и молекулярных данных дает основания полагать, что амебы штамма Varz24.1 представляют собой новый вид рода *Leptomyxa*, который должен быть систематически описан.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 23-74-00050) с использованием оборудования РЦ СПбГУ «Культивирование микроорганизмов», «Биобанк» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий». Авторы признательны Савелию Полузерову за сбор образца мха.

СОЕДИНЕНИЯ НА ОСНОВЕ ДОНОРНО-АКЦЕПТОРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

М.А. Кулакова[1], Д.А. Славнова[1], М.В. Золотов[2], Е.Д. Благодарная[2], Ю.В. Самсонова[1], А.М. Петерс[3], Р.А. Акасов[1,2], Т.В. Егорова[1], Ю.Н. Лупоносов[2]

1. *Медицинский университет Петровского, Москва, Россия*
2. *Институт синтетических полимерных материалов имени Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия*
3. *Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия*

E-mail: kulakova_ma@univer.med.ru*
slavnova_da@univer.med.ru

Распространение антибиотикорезистентных штаммов бактерий требует разработки новых противомикробных стратегий. Фотодинамическая терапия с использованием наночастиц-фотосенсибилизаторов является перспективным подходом: при

облучении светом они генерируют активные формы кислорода (АФК), вызывающие окислительное повреждение клеточных структур и гибель бактериальной клетки. Особый интерес представляют органические наночастицы на основе донорно-акцепторных соединений, способные функционировать при облучении в окне прозрачности биологических тканей (в видимой и ближней ИК-области спектра, 650–900 нм), где свет максимально проникает в биологические ткани. Целью данного исследования стала оценка возможности применения органических частиц на основе донорно-акцепторных соединений в качестве антимикробных агентов. В работе использованы два низкомолекулярных органических полупроводника-наночастицы двух видов, построенных по принципу акцептор–донор–акцептор, что обеспечивает интенсивное поглощение света. Соединения гидрофобны, поэтому в водную среду их переводили в виде наночастиц методом переосаждения. Исследовано влияние органических наночастиц двух видов на жизнеспособность *E. coli*. Показано, что фотоактивация при 730 нм и дозе 30 Дж/см² ведет к полному ингибированию роста. Соединения вызывают фоторасщепление плазмидной ДНК. Степень расщепления зависит от дозы света и концентрации. Под действием АФК деградирует геномная ДНК *E. coli*. В темноте токсичность отсутствует. Таким образом, наночастицы вызывают гибель бактерий и деградацию ДНК/РНК. Установлена корреляция между деградацией нуклеиновых кислот и снижением жизнеспособности *E. coli*. Результаты обосновывают перспективность органический наночастиц для антимикробной фотодинамической терапии резистентных штаммов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-13-00422).

ОСОБЕННОСТИ ТРЕХМЕРНОЙ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СПОР *NUCLEOPHAGA AMOEBAE* (OPISTHOKONTA: ROZELLOMYCOTA)

Камышацкая О.Г.[*1], Шкляр А.А[1], Иванова А.Н.[2], Насонова Е.С[1].

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: oksana.kamyshatskaya@gmail.com*

Nucleophaga amoebae — один из представителей облигатных паразитов, входящих в состав группы Rozellomycota вместе с классическими микроспоридиями. За исключением последних, разнообразие розелломикот представлено в основном последовательностями генов рРНК, полученными из метагеномных данных. Лишь для немногих из них имеются таксономические описания и данные о тонком строении.

Один из уникальных морфологических признаков микроспоридий, имевший большое значение в их эволюции — наличие в спорах специфического аппарата инвазии. Он представляет собой сложноорганизованный комплекс органелл, которые участвуют в процессе доставки в клетку хозяина инфекционного начала, спороплазмы, путем экструзии по полярной трубке. Схожесть жизненных циклов и филогенетическое родство нуклеофаг с микроспоридиями позволяет ассоциировать органеллы в их спорах с определенными элементами аппарата экструзии классических микроспоридий. Хотя полностью сопоставить их друг с другом не удается — соответствие некоторых органелл может по-разному интерпретироваться разными авторами.

Согласно нашим предыдущим ультраструктурным исследованиям, споры *Nucleophaga amoebae* не обладают длинными полярными трубками, образующими витки спирали, а также не имеют поляропласта. Органеллы, обнаруженные на срезах спор, имеют

наибольшее сходство с элементами аппарата проникновения мечниковеллид (базальной группы микроспоридий): манубриумом — толстой, не закрученной полярной трубкой и тубуло-везикулярной сетью манубриальной складки.

В настоящей работе мы исследуем пространственную организацию спор *Nucleophaga amoebae* и анализируем взаимосвязь органелл, ассоциирующихся с элементами аппарата инвазии мечниковеллид и классических микроспоридий. А также впервые предлагаем трехмерную реконструкцию спор, осуществленную на серийных ультратонких срезах при помощи программного обеспечения Thermo Sientific AVIZO 2019.1. Полученные данные показывают уникальные особенности спор *Nucleophaga amoebae* и свидетельствуют, по-видимому, об отличном от типичного для классических микроспоридий процессе заражения клетки хозяина путем экструзии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 23-74-00071) с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ.

ПЕРВЫЙ СЛУЧАЙ ОБНАРУЖЕНИЯ ПАРАЗИТА РУКОКРЫЛЫХ *TRYPANOSOMA DIONISII* В СЕВЕРНОМ КОЖАНКЕ *EPTESICUS NILSSONII* В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

Киричко А.А.[1*], Василькова Ю.В.[2], Махараткина М.П.[2], Кутенина Э.О.[2], Гусева Н.В.[2], Ганюкова А.И[3]

1. *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*
2. *СПб ГБУК «Ленинградский зоологический парк», Санкт-Петербург, Россия*
3. *ФГБУН «Зоологический институт РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: kaog07672@gmail.com*

В контексте трансмиссивных инфекций семейство *Trypanosomatidae* известно как тропической, так и широкой медицине. В его составе род *Trypanosoma* наряду с классическими возбудителями заболеваний включает возможных оппортунистов. Они относятся к так называемой «кладе *T. cruzi*», возбудителя американского трипаносомоза, и демонстрируют *in vitro* способность к заражению клеток человека (Maeda et al., 2012). Среди таких простейших *Trypanosoma dionisii*, паразит кровососущих насекомых и летучих мышей, уникальна описанной в рамках двух клинических наблюдений (Silva et al., 2020; Xu et al., 2024) способностью к ко- и моноинфекции иммуннокомпрометированных пациентов.

В свете указанной особенности значима широта распространения *T. dionisii*: сообщают об изолятах из Бразилии, Мексики, Австралии, Китая, Японии и других стран (Juarez-Gabriel et al., 2024; Austen et al., 2021). В России первая находка была зарегистрирована в материале от клещей *Steatonyssus periblepharus* (Malysheva et al., 2023).

Проанализированы образцы, полученные от летучих мышей Санкт-Петербурга и Ленинградской области, Московской и Псковской областей, а также эктопаразитов рукокрылых. Методами световой микроскопии и вложенной ПЦР с праймерами, отобранными для

Trypanosoma spp., T. dionisii обнаружена в мазках крови от проявлявшего симптомы рукокрылого, предоставленных Реабилитационным центром летучих мышей при Ленинградском зоопарке. Было проанализировано 14 образцов, принадлежащих к видам *Eptesicus nilssonii, Vespertilio murinus* и *Plecotus auritus*. Инфекция выявлена у 1 образца, полученного от северного кожанка *E. nilssonii*. Филогенетический анализ с использованием гена 18S рРНК указывает на близость новой находки первому изоляту, выделенному в Ленинградской области (Malysheva et al., 2023). Уточнение положения данного образца особенно важно в контексте возможности его родства с полученным в Китае и способным к заражению человека.

Работа выполнена при поддержке Государственного задания № 125012800903-5 на оборудовании ЦКП «Таксон» ЗИН РАН (Санкт-Петербург, Россия).

ЖГУТИКОНОСЦЫ *TRYPANOPLASMA* SP. ИЗ КРОВИ БАЙКАЛЬСКОЙ ПЕСЧАНОЙ ШИРОКОЛОБКИ *LEOCOTTUS KESSLERII*

Кокорина Т.С.[1], Ганюкова А.И.[2], Балданова Д.Р.[3], Хамнуева Т.Р.[3]

1. *РГПУ имени А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБУН «Зоологический институт РАН», Санкт-Петербург, Россия*
3. *Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия*

E-mail: taisiya.kokorina@gmail.com*

Байкальская песчаная широколобка *Leocottus kesslerii* является эндемиком озера Байкал. Вид распространен по всему Байкалу, наибольшая численность наблюдается на глубинах до 50–70 м на песчаных или песчано-илистых грунтах, однако для размножения

мигрируют на мелководье в конце мая–начале июня. Не имея самостоятельного промыслового значения, она служит кормовой базой для хищных ценных промысловых рыб — налима, омуля, осетра, а также байкальской нерпы.

Исследования прошлых лет позволили выявить в крови байкальской песчаной широколобки широкий спектр кровепаразитов, среди которых споровики рода *Haemogregarina* и представители родов *Trypanosoma* и *Trypanoplasma*, однако ранее молекулярные исследования этих организмов не проводились.

В данной работе проведена первая молекулярная идентификация трипаноплазм песчаной широколобки озера Байкал. Исследована кровь 18 рыб, собранных в мае 2025 г. в окрестностях станции Горячинск. Микроскопические исследования кровяных мазков позволили выявить крупные (до 80 мкм) клетки с двумя жгутиками: коротким, направленным вперёд, и задним, который тянется вдоль клетки к её заднему концу и формирует ундулирующую мембрану. Для молекулярно-генетических исследований проводилось выделение геномной ДНК из ~50 мкл крови 18 рыб. В качестве метода диагностики была выбрана высокочувствительная гнездовая ПЦР гена 18S рРНК, поскольку данная методика позволяет выявлять заражения при низком уровне паразитемии. Положительный сигнал был обнаружен у 14 проанализированных образцов.

Полученные в ходе секвенирования нуклеотидные последовательности длиной в ~500 нуклеотидов сравнивали с последовательностями, представленными в базе GenBank. Анализ по BLAST показал, что идентифицированные паразиты демонстрируют значительное (98.8%) сходство с *Trypanoplasma borreli*, однако наличие единичных нуклеотидных замен (от 1 до 3) может свидетельствовать о существовании локальной вариабельности возбудителя в популяции байкальского эндемика.

Высокая частота встречаемости (14 из 18 особей) свидетельствует о значительной распространенности трипаноплазмоза среди исследованной группы рыб, что открывает новые перспективы для

изучения путей передачи паразитов и их воздействия на популяции эндемичных гидробионтов.

Работа выполнена при поддержке Государственного задания № 125012800903-5 на оборудовании ЦКП «Таксон» ЗИН РАН (Санкт-Петербург, Россия).

ОСОБЕННОСТИ МИТОЗА ЛОБОЗНОЙ АМЁБЫ THECAMOEBA AESCULEA (AMOEBOZOA, DISCOSEA)

Коломытцева А.К.[1*], Мезенцев Е.С.[1]

1. *Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: kolomci@mail.ru*

Деление ядра — неотъемлемая часть клеточного цикла эукариот. Несмотря на то, что лобозные амёбы — известные модели цитологических исследований, особенности их митоза по-прежнему малоизучены. Проведённые исследования были ограничены уровнем световой микроскопии, а ультраструктурные данные получены лишь для единичных представителей группы.

Разнообразие вариантов митоза у лобозных амёб, по-видимому, недооценено. При наблюдении за делящимися клетками *Thecamoeba aesculea* мы обнаружили формирование уникальных структур, что послужило стимулом для более подробного изучения этого процесса. В качестве первого этапа исследования мы провели наблюдения с использованием оптики, оснащённой дифференциально-интерференционным контрастом.

Интерфазные ядра амеб *T. aesculea* содержат одну сферическую центрально расположенную структуру, традиционно называемую ядрышком. К началу деления ядрышко деконденсируется. В центре ядра возникает облако, отличное по оптической плотности от остальной части нуклеоплазмы и, предположительно, являющееся хромосомами. В дальнейшем эта структура разделяется на две, и они

движутся к противоположным полюсам ядра. Вокруг этих облаков формируются тонкостенные капсулы. Диаметр капсул постепенно увеличивается, а содержащиеся в них структуры становятся менее заметными. Затем внутри капсул возникает множество мелких гранул, схожих по оптической плотности с ядрышком интерфазного ядра. Капсулы начинают расходиться в противоположные стороны. При этом ядерная оболочка деформируется, приобретая гантелевидную форму. В пространстве между расходящимися капсулами видны тяжи, тянущиеся от одной капсулы к другой. Завершается кариокинез истончением перемычки, содержащей тяжи, и сближением ядерной оболочки с границами капсул. В результате в клетке образуются два дочерних ядра, после чего следует цитокинез. Дочерние клетки несут по одному ядру с мелкими ядрышками. Сопоставление наших наблюдений с литературными данными позволяет утверждать, что затем многочисленные ядрышки сливаются, формируя ядро везикулярного типа. Формирующиеся в пределах делящегося ядра капсулы — отличительная особенность митоза *T. aesculea*. Подобные структуры не были описаны ни у одного вида лобозных амеб на современном уровне, и на данный момент мы не можем точно определить их природу.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 23-74-00050) с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Культивирование микроорганизмов» Научного парка СПбГУ.

СИНТЕЗ БЕЛКА RECN В КЛЕТКАХ *E. COLI* ПРИ АКТИВАЦИИ SOS-ОТВЕТА РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ

Кряжев Р.А.[1*], Морозова Н.Е.[1]

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

E-mail: ruslan.kryajev@yandex.ru*

SOS-ответ является комплексным механизмом репарации повреждённой ДНК и одним из путей мутагенеза у бактерий. В активации этого процесса участвуют такие белки как LexA, RecA, RecN, SulA и другие. Известно, что RecA способствует автопротеолизу белка LexA, который является репрессором генов SOS-бокса. Рекомбиназа RecA образует в клетке спиралевидные структуры вокруг молекул ДНК и нередко колокализуется с белком RecN. RecN относится к классу SMC-подобных белков и в паре с RecA участвует в компактизации ДНК в процессе SOS-ответа. Однако молекулярные механизмы действия RecN остаются слабо изученными (Vikedal et al., 2025).

Ранее нашей научной группой был получен модифицированный штамм *E. coli*, несущий в своём геноме последовательности, кодирующие белки RecA и RecN, слитые с генами флуоресцентных белков. Такая конструкция позволяет визуализировать экспрессию изучаемых белков методом флуоресцентной микроскопии (Нестеренко и др., 2025).

Для изучения локализации и динамики синтеза белков RecA и RecN в клетках *E. coli* необходимо было индуцировать в них SOS-ответ. SOS-ответ индуцировали двумя способами: с помощью облучения ультрафиолетом и воздействия антибиотика ципрофлоксацина. В первом случае доля клеток с длиной более 6 мкм в первые 60 минут после облучения увеличивалась, а на 90-ой минуте снизилась до уровня контроля. Доля делящихся клеток с видимой поперечной перетяжкой первые 30–60 минут после облучения уменьшилась в 3 раза по сравнению с контролем, а на 90-ой минуте уменьшилась ещё приблизительно в 3 раза. Доля клеток с фокусами RecN при

облучении ультрафиолетом выросла с 1,6% до 10%. В интервале с 30 до 90 минут воздействия этот уровень не менялся.

При воздействии на клетки ципрофлоксацином было отмечено, что с увеличением времени экспозиции доля удлинённых клеток пропорционально росла с 58 до 84%, доля делящихся клеток оставалась на уровне 2–5% (контроль 11–28%). Доля клеток, содержащих фокусы RecN, через 30 и 60 минут составляла порядка 50%, через 90 минут — более 90%.

При использовании ципрофлоксацина возможно получить большой процент клеток с фокусами RecN. Также наблюдаются изменения в морфологии клеток: значение средней длины одной клетки возрастает с 6 мкм в контроле до 10 мкм. Таким образом, этот метод использовался нами для оценки количества и взаимной локализации белков RecA и RecN в клетках *E. coli* после возникновения двунитевых разрывов ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-74-00085).

ПОЧВЕННЫЕ AMOEBOZOA, ВЫДЕЛЕННЫЕ ПРИ ПОВЫШЕНОЙ СОЛЕНОСТИ: РАЗНООБРАЗИЕ, ДИАПАЗОНЫ ТОЛЕРАНТНОСТИ К СОЛЕНОСТИ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ С МОРСКИМИ ВИДАМИ.

Палатайкова М.[1*], Кудрявцев А.А. [1]

1. *ФГБУН «Зоологический институт РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: Maria.Palataykova@zin.ru*

Почвы представляют собой один из наиболее разнообразных, но все еще недостаточно изученных биотопов с точки зрения разнообразия протистов (Geisen et al., 2018). При этом значительная часть амебоидных протистов может оставаться невыявленной при использовании стандартных методов культивирования (Foissner,

2008). Увеличить количество выявляемых видов могло бы помочь повышение солености среды при высеве, позволяющее выделять организмы, способные переносить солоноватые и морские условия (Smirnov, 2007).

В данной работе исследовались представители Amoebozoa, выделенные из почвенных проб, собранных вблизи солоноватоводных биотопов и из удаленных от них локаций. Для выявления амеб, способных развиваться при повышенной солёности, образцы инкубировали в средах с солёностями 18 и 30‰. Обнаруженные штаммы Amoebozoa идентифицировали по морфологическим и молекулярно-филогенетическим данным. Также оценивали диапазоны их толерантности к солёности.

Полученные данные показывают, что культивирование при повышенной солености позволяет выявлять разнообразные почвенные Amoebozoa, включая формы, ранее не обнаруживаемые при стандартных условиях. Для ряда штаммов была показана способность сохранять жизнеспособность и активно размножаться в широком диапазоне солёности, что указывает на высокую экологическую пластичность. Молекулярно-филогенетический анализ показал, что некоторые почвенные изоляты близкородственны видам из морских или солоноватоводных биотопов. Это свидетельствует о недооцененной связи между почвенными и водными сообществами Amoebozoa, а также о том, что почвы, включая удаленные от морских биотопов местообитания, могут служить резервуаром линий, адаптированных к изменяющимся условиям солености.

Таким образом, экспериментальное повышение солености является эффективным инструментом для изучения разнообразия почвенных Amoebozoa. Полученные результаты расширяют представления об экологических диапазонах, биогеографии и филогенетических связях амебоидных протистов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-14-00278), использовано оборудование ЦКП «Таксон» ЗИН РАН.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ АМЕБ РОДА *LEPTOMYXA* (AMOEBOZOA, TUBULINEA, LEPTOMYXIDA): ОЦЕНКА ФРАГМЕНТА ГЕНА COX1 В КАЧЕСТВЕ ДНК-БАРКОДА

Кулишкин Н.С.[1*]

1. *Санкт-Петербургский Государственный Университет, Биологический Факультет, кафедра Зоологии беспозвоночных, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: n.kulishkin@spbu.ru*

Систематика амебоидных протистов традиционно основывалась на морфологических и цитологических признаках. С развитием и распространением молекулярных методов в систематике стала активно использоваться молекулярная филогенетика. Традиционно для реконструкции филогении амеб супергруппы Amoebozoa используются последовательности гена 18S рРНК. Широкое использование этого гена как филогенетического маркера обусловлено его мозаичной структурой, включающей чередующиеся консервативные и вариабельные регионы. За последние 35 лет была собрана большая база последовательностей гена 18S рРНК амеб из разных филогенетических линий. Это позволяет использовать его для построения филогенетических деревьев на уровне отдельных родов и для супергруппы Amoebozoa в целом.

Однако только последовательности, обладающие достаточным уровнем изменчивости, подходят для построения филогенетических деревьев с высоко поддержанными кладами и оптимальными генетическими дистанциями. В то же время для амеб отряда Leptomyxida характерен крайне низкий уровень изменчивости гена 18S рРНК. Это значительно затрудняет филогенетический анализ и

приводит к различиям в топологиях деревьев, построенных с использованием методов максимального правдоподобия и байесовского подхода, и к формированию неподдержанных клад. Таким образом, в практику филогенетического анализа лептомиксид необходимо внедрить последовательности более вариабельных маркеров.

В этом исследовании мы оценили пригодность фрагмента гена Cox1 в качестве ДНК-баркода для амеб рода *Leptomyxa*. Нами были получены 10 последовательностей гена 18S рРНК и 19 последовательностей фрагмента гена Cox1 лептомиксид. Попарное сравнение показало, что уровень идентичности между последовательностями гена 18S рРНК составляет 91,2–99,9%, а между последовательностями гена Cox1 — 76,2–99,5%. По этим последовательностям были построены филогенетические деревья. Топология филогенетического дерева, основанного на последовательностях гена Cox1, слегка отличается от топологии дерева, основанного на последовательностях гена 18S рРНК, генетические расстояния между видами в нем больше, а поддержки клад выше. Это подтверждает, что, как и в других группах организмов, ген Cox1 является более чувствительным ДНК-баркодом для различения близких видов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 23-74-00050). Работа выполнена с использованием оборудования РЦ СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Культивирование микроорганизмов» и «Центр Биобанк».

РОЛЬ МИКРОБИОМА ЖЕЛЧИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОПИСТОРХОЗА, ВЫЗВАННОГО *OPISTHORCHIS FELINEUS*

Запарина О. [1*], Лишай Е.А. [1,2], Писаренко Н.Б. [1,2]
Пахарукова М.Ю. [1]

1. *ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*
2. *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

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

В последние годы всё большее внимание уделяется роли микробиома в развитии и осложнении различных заболеваний, включая аутоиммунные и воспалительные процессы, нейродегенеративные заболевания и колоректальный рак. Описторхоз, вызываемый *Opisthorchis felineus*, является широко распространённым гельминтозом на территории Западной Сибири, где заражённость сельского населения достигает 60%. При этом взаимодействия между гельминтом, микробиотой и иммунной системой хозяина, а также роль микробиоты в патогенезе описторхоза остаются недостаточно изученными.

Особый интерес представляют *Helicobacter pylori*, ассоциированные не только с развитием рака желудка, но и с рядом гепатобилиарных заболеваний. На основании литературных и собственных данных была выдвинута гипотеза о том, что патогенность описторхоза может быть связана в том числе с экспансией бактерий в желчных протоках печени.

Целью исследования было выявить особенности взаимоотношений «микробиота–паразит–хозяин» в патогенезе описторхоза у пациентов.

Методом массового параллельного секвенирования V3–V4 региона гена 16S рРНК был проанализирован состав микробиома желчи у пациентов, инфицированных и не инфицированных *O. felineus*, а также оценено α-разнообразие микробиоты по индексу Шеннона. Выявлены как общие, так и специфические качественные и

количественные изменения состава микробиоты желчи. Наиболее выраженные различия касались численности отдельных микроорганизмов и филогенетического разнообразия микробиомов у пациентов исследуемых групп. С помощью гистологического и иммуногистохимического анализов было выявлено наличие бактерий рода *Helicobacter* в аутопсийном материале желудка и печени пациентов с описторхозом.

Полученные данные свидетельствуют о том, что *O. felineus* ассоциирован с изменением состава билиарной микробиоты и могут указывать на возможную роль бактериального компонента, в том числе *Helicobacter* spp., в патогенезе описторхоза. Результаты исследования могут быть использованы для совершенствования диагностики и подходов к лечению как трематодозов, так и бактериальных инфекций, включая *H. pylori*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 26-25-20108) и Правительства Новосибирской области - Соглашение (№ 30-2026-001277).

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ГРУППЫ ВИДОВ THECAMOEBA SIMILIS (AMOEBOZOA; DISCOSEA)

Мезенцев Е.С.[1*], Шкляр А.А. [1], Чикадзе Е.Д. [1], Суркова А.А. [1], Кулишкин Н.С. [1], Дуреев М.В. [1], Смирнов А.В. [1]

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

E-mail: e.mezentsev@spbu.ru*

Амебы рода *Thecamoeba* Fromentel, 1874 широко распространены в окружающей среде и могут быть изолированы из морских, пресноводных и наземных местообитаний. До недавнего времени род *Thecamoeba* считался одним из немногих таксонов амеб, виды которого можно было относительно легко идентифицировать с помощью световой микроскопии. Однако недавние молекулярные

исследования продемонстрировали значительное генетическое разнообразие внутри «классических» морфологически различимых видов текамеб. В связи с этим в роде были описаны группы близких видов. Амебы в таких группах имеют схожую, слабо отличающуюся морфологию, которая не позволяет провести видовую идентификацию по одиночным клеткам без получения молекулярных данных.

В процессе изучения амеб из наземных и пресноводных местообитаний, нами были описаны четыре группы близких видов. Наиболее часто удавалось изолировать амеб группы видов *Thecamoeba similis*, что позволило собрать обширную базу последовательностей генов 18S рРНК и COI. Неоднократно были надежно реизолированы уже известные виды из удаленных географических точек, что в том числе подтвердило стабильность гена 18S рРНК и возможность его использования как удобного генетического маркера. Изучение собранной коллекции штаммов и анализ молекулярных данных позволил описать несколько новых видов, а также проанализировать генетическую структуру этой группы видов. В результате анализа гена COI (аминокислотные и нуклеотидные последовательности) и вариабельных участков гена 18S рРНК, мы выявили молекулярные сигнатуры, которые могут быть использованы как удобные баркоды для идентификации представителей этой группы на разных таксономических уровнях. Для отдельных, наиболее удобных для идентификации вариативных участков гена 18S рРНК была смоделирована вторичная структура, что позволило показать качественные различия между амебами из крупных клад. Этот подход может обеспечить лучшее понимание границ между «видами» агамных организмов и послужить основой для удобной систематизации родственных видов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 23-74-00050); с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Культивирование микроорганизмов» Научного парка СПбГУ.

ВЛИЯНИЕ СМЕШАННЫХ СТАРТОВЫХ КУЛЬТУР ДРОЖЖЕЙ НА КИСЛОТНОСТЬ БЕЛОГО ВИНА ДОЛИНЫ ДОНА

Михайленко Д.О.[1*]

1. *ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия*

E-mail: domihailenko@gmail.com*

Одной из тенденций в современном виноделии является создание смешанных стартовых культур с производственным штаммом *Saccharomyces cerevisiae* и несахаромицетным видом дрожжей. Титруемая кислотность является важным показателем, отражающим количество кислот в вине и потенциал хранения вина. Считается, что использование несахаромицетных видов в составе смешанных стартовых культур приводит к повышению кислотности вина.

Цель исследования — изучить влияние смешанных стартовых культур дрожжей с несахаромицетным видом *Hanseniaspora uvarum* на кислотность белого вина.

Для исследования было взято 3 культуры дрожжей: коммерческий производственный штамм *S. cerevisiae* (IOC B 3000, Франция) и два штамма несахаромицетного вида *H. uvarum*. Для брожения использовался сок белого технического сорта винограда Ефремовский, автохтонного для Долины Дона. При брожении использовалась следующая схема: производственный контроль *S. cerevisiae*, монокультуры *H. uvarum* и смешанные стартовые культуры для каждого штамма *H. uvarum* (сначала осуществлялась инокуляция *H. uvarum*, через определенные временные промежутки (0 ч, 24 ч, 48 ч) — инокуляция *S. cerevisiae*). Для определения титруемой кислотности использовался метод прямого титрования.

Содержание титруемых кислот варьировало в диапазоне от 4,5 до 6,9 г/л. Начальная титруемая кислотность сока составила 7,0 г/л. Максимальное значение было получено при использовании смешанных стартовых культур при наибольшем временном промежутке между инокуляциями. Минимальное значение

получено при использовании контрольной культуры. При использовании смешанных стартовых культур с *H. uvarum* получены высокие показатели титруемой кислотности (6,0–6,9 г/л), причем увеличение содержания происходило при увеличении временного промежутка между инокуляциями. Использование в стартовых культурах несахаромицетных видов приводит к увеличению концентрации маннопротеинов в вине во время брожения (Domizio et al., 2014; Balmaseda et al., 2021). Маннопротеины дополнительно уменьшают снижение количества винной кислоты, основного компонента титруемой кислотности. Предположительно, меньшие снижения уровня титруемой кислотности, полученные в результате исследования, происходят благодаря протекторному действию несахаромицетных штаммов дрожжей в составе смешанных стартовых культур за счёт маннопротеинов. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности смешанных стартовых культур с несахаромицетным видом для биоконтроля кислотности вина.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ И ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Онасенко К.А.[1*], Амирджанов Ф.Ф.[1], Празднова Е.В.[1]

1. *ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия*

E-mail: ksenya.onasenko@mail.ru*

Основу антибиотического потенциала микроорганизмов *Bacillus* обеспечивают циклические липопептиды (ЦЛП), к которым относятся сурфактины, итурины и фенгицины (Zhao et al., 2017; Fira et al., 2018).

Целью данной работы является выделение вторичных метаболитов *Bacillus*, их химическая и биологическая характеристика.

Объектами исследования послужили штаммы *Bacillus atrophaeus* AG8, *Bacillus safensis* AG46, *Bacillus amyloliquefaciens* B1895 и серия

клонов, полученных направленной делецией регуляторного гена *abr*B (Δ*abr*B).

Культивирование проводили на модифицированной минеральной среде (ММС) с исключением железа и добавлением аминокислот-предшественников. Выделение метаболитов осуществляли методом кислотного осаждения (pH 2,0) с последующей твердофазной экстракцией 96% этанолом и колоночной хроматографией. Химически охарактеризованы методами спектрофотометрии, MALDI-TOF и CAS-теста. Биологическую активность оценивали *in vitro* методом микроразведений в отношении *Fusarium graminearum* (Fus-1), Fusarium sp. (Fus-T) и *Cladosporium* sp., а также *S. aureus* и *E. coli* YM83. В результате спектрофотометрического анализа был выявлен пик при 227 нм, характерный для $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов в амидных связях пептидного остова, что подтверждает их пептидную природу. Слабовыраженный пик поглощения при 325 нм отнесен к электронным переходам $\pi \rightarrow \pi^*$ в карбонильных группах пептидных связей, находящихся в специфическом микроокружении (например, в составе лактонного кольца или вблизи жирнокислотного хвоста), либо к наличию сопряженных двойных связей в алифатических цепях.

Методом MALDI-TOF в составе вторичных метаболитов штамма B1895 и его клонов идентифицированы фенгицин и бацитрацин. Присутствие фенгицина в образцах согласуется с результатами геномного анализа (antiSMASH).

Результаты CAS-теста подтверждают способность исследуемых изолятов вырабатывать железо-связывающие соединения в условиях культивирования на ММС и однозначно демонстрируют высокую сидерофорную активность. Концентрация сидерофоров в выделенных фракциях выше, чем в культуральной жидкости, за исключением клонов K39 и K3.

Установлена высокая противогрибковая активность метаболита клона K39 в отношении *Fusarium graminearum* (Fus-1) и антибактериальная активность метаболитов клонов K40, K49 и K26 (в отношении *S. aureus* >40%). В отношении грамотрицательной *E.*

coli YM83 наиболее эффективными оказались метаболиты клонов K39, K14 и K27 (ингибирование до 43,4%).

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (проект № FENW-2026-0019).

ИНТЕГРАТИВНЫЙ ПОДХОД К ИДЕНТИФИКАЦИИ *NEOPARAMOEBA BRANCHIPHILA* (AMOEBOZOA, DACTYLOPODIDA): МОРФОЛОГИЯ, ЦИТОСКЕЛЕТ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДАННЫЕ

Полежаева В. А.[1*], Волкова Е. Н. [1], Шмакова Л. А[2].

1. *ФГБУН «Зоологический институт РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Israel Oceanographic and Limnological Research (IOLR), Tel-Shikmona, Haifa, Israel.*

E-mail: polezhaevalera@yandex.ru*

Представители вида *Neoparamoeba branchiphila (*Dyková et al., 2005) широко известны как факультативные паразиты и ассоциируются с амебной болезнью жабр у морских рыб. Данный штамм *N. branchiphila* 11_10 был впервые выделен из донного грунта зоны холодных метановых высачиваний Пальмахим (Средиземное море, 32,1667° с. ш., 34,2333° в. д., глубина 1200 м), что расширяет известные экологические границы вида. Разграничению близкородственных видов *Neoparamoeba* препятствует недостаток морфологических и молекулярных данных на фоне накопления сведений о новых штаммах. В связи с этим актуальность приобретает интегративный подход, сочетающий морфологические, цитологические и молекулярные методы исследования. Особенностью рода *Neoparamoeba* является наличие эндосимбионта — перкинселлоподобного организма (PLO), находящегося возле ядра клетки хозяина. Причины такой локализации неизвестны, и

интегративный подход, включающий иммунофлуоресцентный анализ, может помочь в их изучении.

Цель работы — комплексная характеристика выделенного штамма, идентифицированного как *N. branchiphila*, включающая анализ морфологических и морфометрических данных; исследование организации тубулинового цитоскелета методом иммунофлуоресцентной микроскопии, филогенетический анализ на основе ядерного гена 18S рРНК и митохондриального гена субъединицы 1 цитохромоксидазы (COI), расчёт генетических дистанций и оценка нуклеотидного разнообразия (на основе последовательности гена 18S рРНК).

Морфометрический анализ выявил статистически значимые отличия от близкородственных видов *N. longipodia* (Volkova and Kudryavtsev, 2017) и *N. Aestuarina* (Page, 1970). При окрашивании α-тубулина в системе «хозяин - эндосимбионт» в клетке амебы наблюдались единичные сигналы (динамика микротрубочек или артефакт фиксации). У эндосимбионта — кольцевые тубулиновые структуры со стяжками, но ограничения метода не позволяют предложить общую схему его цитоскелета. Анализ нуклеотидного разнообразия и распределения генетических дистанций показал, что штамм 11_10 находится внутри диапазона внутривидовой изменчивости *N. branchiphila* и достоверно отличается от близкородственного вида *N. longipodia*. Результаты подтверждают принадлежность штамма к виду *N. branchiphila* и эффективность интегративного подхода для диагностики близкородственных видов Neoparamoeba.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-14-00278) с использованием оборудования ЦКП «Таксон» ЗИН РАН.

РАЗНООБРАЗИЕ АМЕБОИДНЫХ ПРОТИСТОВ В ПРЕСНОВОДНЫХ И СОЛОНОВОДНЫХ ФОРЕЛЕВЫХ ХОЗЯЙСТВАХ НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ И ЮГЕ РОССИИ

Рябушева У.Д.[1,2*], Кудрявцев А.А.[1]

1. *Лаборатория клеточной и молекулярной протистологии, Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: ryabysheva1411@gmail.com*

Амебоидные протисты из разных супергрупп эукариот населяют разнообразные природные и антропогенные биотопы, в том числе объекты аквакультуры. Накопленные данные свидетельствуют о том, что разнообразие амёб в рыбных хозяйствах представлено ограниченным набором повторяющихся таксонов, что позволяет предположить значение объектов аквакультуры как локального эдификатора, формирующего специфическое сообщество амебоидных протистов. В составе такого сообщества могут присутствовать виды, потенциально вовлечённые в развитие болезней рыб. Особый интерес представляет узелковая болезнь жабр (NGD – Nodular Gill Disease), этиологический агент которой пока не установлен. Одним из критериев оценки потенциальной патогенности амёб является их способность преодолевать порог критической солёности 5-8‰, соответствующий уровню минерализации тканевой жидкости рыб.

Нами были изучены пробы воды и жаберных соскобов из форелевых хозяйств, расположенных в Ладожском озере (Карелия), Выборгском заливе (Ленинградская область) и реке Курентедон (Северная Осетия). Из проб был выделен 31 штамм амебоидных протистов. Идентификацию проводили с использованием интегративно-таксономического подхода. Штаммы принадлежали к не менее чем 25 видам из групп Amoebozoa и Heterolobosea. Шесть штаммов идентифицированы как известные виды *Ptolemeba bulliensis*, *Copromyxa cantabrigiensis*, *Vannella* cf. *persistens*,

Cochliopodium minus, *Pseudoparamoeba pagei*, *Allovahlkampfia* sp. Остальные штаммы принадлежали к не менее 19 новым для науки таксонам, включая новые виды родов *Ripella*, *Micriamoeba*, *Vannella*, *Paravannella*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Neovahlkampfia* и представителей новых клад высокого ранга в классах Tubulinea и Discosea.

Сравнение наших результатов с данными аналогичных исследований показало, что найденные нами представители *Ripella* spp., *P. bulliensis*, *Naegleria* sp., *Micriamoeba* spp. и Tubulinea group 02 регулярно встречаются в географически удалённых хозяйствах, что указывает на их приуроченность к местам выращивания форели. Порог критической солёности преодолевали все изученные виды, за исключением амёб из новой клады Discosea.

Таким образом, большинство амебоидных протистов, регулярно обнаруживаемых в форелевых хозяйствах, потенциально способны выживать во внутренней среде рыб, что обосновывает их дальнейшее изучение в качестве кандидатов в возбудители NGD.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Таксон» ЗИН РАН при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-14-00278).

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *SALMONELLA* TYPHIMURIUM НА ОСНОВЕ ПАНГЕНОМНОГО АНАЛИЗА

Саитова А. Т.[1*], Жамборова С. Х.[1], Полев Д. Е.[1], Макарова М. А.[1,2]

1. *ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: saitova@pasteurorg.ru*

Введение. *Salmonella enterica* серовар Typhimurium — ведущий возбудитель сальмонеллезов. Отмечается рост монофазных вариантов (I 4,[5],12:i:-), ассоциированных с множественной резистентностью. Данные о генетическом разнообразии петербургских штаммов отсутствуют. Пангеномный анализ позволяет охарактеризовать популяционную структуру и выявить маркеры резистентности.

Цель. Провести сравнительный пангеномный анализ и охарактеризовать структуру детерминант антимикробной резистентности у штаммов *S.* Typhimurium, выделенных в Санкт-Петербурге.

Материалы и методы. Проанализированы 603 штамма: 102 изолята из Санкт-Петербурга (2020–2025 гг.) и 501 геном из NCBI. Секвенирование на DNBSEQ-G50, сборка геномов в SPAdes, MLST и серовары — MLST 2.0 и SeqSero2, гены резистентности — AMRFinderPlus, пангеномный анализ — Roary.

Результаты. Пангеном 603 геномов включает 19522 гена, что подтверждает его открытый характер. Консервативное ядро (core genome, ≥ 95 % изолятов) составило 3953 гена (20,2 %), тогда как добавочный геном (cloud genes, < 15 %) — 14334 гена (73,4 %). В структуре резистома доминировали гены устойчивости к аминогликозидам (aadA1, aadA2, aph(3")-Ib, aph(6)-Id), β-лактамам

(blaTEM-1), тетрациклинам (tetA, tetB), сульфонамидам (sul1, sul2) и фениколам (floR). Клинически критические маркеры — карбапенемазы (blaNDM, blaVIM), гены устойчивости к колистину (mcr) и плазмидные детерминанты устойчивости к фторхинолонам (qnr) выявлены как редкие эпизодические события (менее 1%). Установлена серовар-ассоциированная вариабельность профилей резистентности: штаммы классического варианта Typhimurium демонстрировали наибольшее разнообразие комбинаций генов устойчивости по сравнению с монофазными вариантами, что указывает на различия в эволюционных траекториях этих групп.

Обсуждение. Открытый пангеном и обилие редких генов подтверждают активный горизонтальный перенос. Доминирование ST19 и ST34 соответствует глобальным трендам распространения эпидемических клонов. Широкое распространение генов устойчивости к антибиотикам первой линии требует рациональной антимикробной терапии. Спорадическое выявление карбапенемаз и mcr диктует необходимость мониторинга.

Заключение. Впервые охарактеризованы популяционная структура и профили резистентности *S.* Typhimurium в Санкт-Петербурге. Результаты обосновывают внедрение полногеномного секвенирования в эпидемиологический надзор.

СРАВНЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ SMC *B. SUBTILIS*, *U. PARVUM* И *M. GALLISEPTICUM*

Сапожникова А.П.[1*], Румянцева Н.А.[1], Кудрявцева М.А. [1], Андреева А.П. [1], Запрягаева Е.Ю. [1], Журавель К.Е. [1], Белевич Я.В. [1], Ведяйкин А.Д. [1]

1. ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: sapogniktos@gmail.com*

Комплексы SMC представляют собой мультисубъединичные белковые комплексы, обеспечивающие компактизацию ДНК посредством экструзии петель. Они присутствуют, по-видимому, у всех живых организмов и имеют консервативную архитектуру, включающую димер Smc, клейзин и вспомогательные субъединицы, стабилизирующие комплекс — белки семейств KITE или HAWK. Среди бактериальных комплексов SMC выделяют комплексы Smc-ScpAB, MukBEF, MksBEF и Wadjet, которые различаются как между различными типами комплексов, так и между гомологичными комплексами из разных организмов по стехиометрии, субъединичному составу и функциональным особенностям. Несмотря на общий механизм экструзии петель, предполагается, что характерные свойства различных комплексов SMC определяют особенности их функционирования, однако их взаимосвязь изучена недостаточно.

Ureaplasma parvum и *Mycoplasma gallisepticum* являются представителями класса *Mollicutes* и характеризуются редуцированным геномом и упрощённой клеточной организацией. Несмотря на это, они имеют комплекс Smc-ScpAB. Благодаря минимальному набору генов микоплазмы представляют собой удобную модель для изучения фундаментальных свойств комплекса Smc-ScpAB. *Bacillus subtilis* — грамположительная аэробная бактерия. По сравнению с микоплазмами *B. subtilis* характеризуется большим размером генома и свободноживущим образом жизни. Сравнение этих эволюционно далёких бактерий позволит

определить, какие свойства комплекса Smc-ScpAB являются консервативными, а какие могли измениться в ходе эволюции.
В данной работе было проведено сравнение комплексов Smc-ScpAB *B. subtilis*, *U. parvum* и *M. gallisepticum*. Методом анализа смещения электрофоретической подвижности EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), было установлено, что комплексы SMC всех исследуемых организмов лучше всего связываются с кольцевой двунитевой ДНК. При этом комплекс *B. subtilis* практически не связывается с линейной двунитевой ДНК. В отличие от него, комплексы SMC *U. parvum* и *M. gallisepticum* демонстрируют лучшее связывание с линейной двунитевой ДНК. Кроме того, белки ScpA и ScpB *U. parvum* способны самостоятельно взаимодействовать с ДНК. Также для комплексов SMC *U. parvum* и *B. subtilis* характерно ингибирование связывания ДНК в присутствии белков ScpA и ScpB.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-74-10022).

ВЛИЯНИЕ ПЛОТНОСТИ ПОПУЛЯЦИИ НА ПОДВИЖНОСТЬ АМЕБОИДНЫХ КЛЕТОК ВОДОРОСЛИ *RHIZOCHROMULINA* SP. B44 (HETEROKONTOPHYTA, DICTYOCHOPHYCEAE)

Семаков М.В[1,2*], Сафонов П.Ю.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: makarsemakov65@gmail.com*

У многих микроорганизмов отмечена способность изменять свой физиологический статус в ответ на изменение плотности их популяции. В том числе, может меняться и подвижность клеток.

Перспективным модельным объектом изучения такого рода межклеточной коммуникации среди одноклеточных амебоидных эукариот может стать водоросль *Rhizochromulina* sp. B44 (Heterokontophyta, Dictyochophyceae). Клетки *Rhizochromulina* образуют тонкие ветвящиеся псевдоподии, содержащие микротрубочки. При этом псевдоподии соседних клеток зачастую сливаются, образуя мероплазмодий. Молекулярные механизмы локомоции микроорганизмов с подобным типом псевдоподий остаются малоизученным. Таким образом, изучение подвижности клеток *Rhizochromulina* также способствует более глубокому пониманию эволюции клеточной подвижности у эукариот в целом.

В ходе работы на инвертированном микроскопе проводили съемки культур, выращивавшихся в течение 13–15 дней, с последующим трекингом клеток на видеозаписях. Статистический анализ данных был проведен посредством обобщенной аддитивной смешанной модели, включавшей следующие факторы: количество треков в кадре (как прокси плотности популяции), время культивирования и случайный фактор — идентификатор серии экспериментов. Зависимая переменная — логарифм величины M, представляющей собой расстояние между первой и наиболее удаленной точкой трека.

В конечном счете, нам удалось продемонстрировать нелинейную взаимосвязь между плотностью популяции клеток и их подвижностью, при этом продолжительность культивирования не оказывала достоверного влияния на зависимую переменную. В области низких значений плотности (≤ 100 клеток в кадре) наблюдались флуктуации уровня подвижности с максимальными значениями при количестве треков около 25 и 75, и минимумом в области 50–55 треков. В диапазоне значений более 150 треков наблюдался небольшой рост уровня подвижности, однако дефицит данных в области средней и высокой плотности популяции не позволяет однозначно интерпретировать наблюдаемую зависимость.

Природа переходов между состояниями с относительно низкой и высокой локомоторной активностью остается неизвестной. Кроме

того, неясен механизм коммуникации между клетками: осуществляется ли она через псевдоподии или с помощью сигнальных соединений, выделяемых в среду. Также предстоит определить радиус окрестности, в которой клетки оказывают значимое влияние на подвижность друг друга.

РАЗРАБОТКА КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ НУКЛЕОПРОТЕИНА SARS-COV-2 РАЗЛИЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ

Таутова А.В.[1*], Рак А.Я. [1], Мясникова И.А. [1]

1. *Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: gniiivm_7@mil.ru*

Введение. Нуклеопротеин SARS-CoV-2 — высококонсервативный антиген, участвующий в упаковке РНК и репликации вируса (Tugaeva et al., 2021). В отличие от спайкового белка, N-белок менее изменчив, что делает его перспективной мишенью для вакцинопрофилактики и диагностики (Харченко, 2020), и, таким образом, задача получения рекомбинантного антигена является актуальной.

Цель. Сравнить аминокислотные последовательности нуклеопротеина исследуемого изолята и референсного варианта Omicron BA.1. На основе консервативных участков разработать универсальные праймеры и сконструировать экспрессионную плазмиду.

Методы. Первичные структуры белков позаимствованы из баз данных NCBI и Expasy. Изолят SARS-CoV-2 из коллекции «ГНИИИ ВМ» МО РФ выделен из ПЦР-позитивного клинического материала больных COVID-19. Изолят отсеквенирован по методу Сэнгера и охарактеризован как вариант Omicron. В программе SeqMan собраны и проанализированы последовательности изолятов. 5'- и 3'-

концевые участки гена идентичны у изолята и штаммов Omicron BA.1, центральная часть содержит точечные замены. На основе идентичных концевых участков в программе SnapGene подобраны праймеры: прямой tattGGATCCaATGTCTGATAAtggacc и обратный ataaGCGGCCGCttaggcctgagttgag с сайтами рестрикции BamHI и NotI для клонирования в pETDuet-1, а также сконструирована плазмида с N-вставкой. Универсальность праймеров проверена *in silico* на последовательностях изолятов Omicron из разных стран (NCBI). Полноразмерный ген N-белка получен ПЦР-амплификацией на матрице кДНК изолята.

Результаты. N-белок исследуемого изолята отличается несколькими аминокислотными заменами: попарное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена нуклеопротеина изолятов «SARS-CoV-2/human/USA/0936-0007BD00-001/2022, SARS-CoV-2/human/DEU/C63/2022 и SARS-CoV-2/human/IND/EPI/ ISL/12223888/2022 показало, что исследуемый изолят из коллекции и IND/EPI/ISL/12223888/2022 полностью идентичны по всей длине; в изоляте USA/0936-0007BD00-001/2022 обнаружена делеция A в позиции 21, а в изоляте DEU/C63/2022 выявлены замена T→W в позиции ~280 и замена A→C в позиции ~1245. Концевые участки всех сравниваемых последовательностей полностью идентичны. Праймеры с BamHI и NotI комплементарны всем проанализированным последовательностям различных вариантов Omicron. Сконструирована экспрессионная плазмида pETDuet-1, содержащая ген N-белка изолята под контролем промотора T7. Разработанная конструкция позволяет получать рекомбинантный нуклеопротеин для иммунологических исследований.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ЛОКОМОТОРНЫХ ФОРМ СВОБОДНОЖИВУЩИХ АМЁБ НА ОСНОВЕ ГЕОМЕТРИИ КОНТУРА

Фофонов М.А.[1*], Волкова Е.Н.[1]

1. *ФГБУН «Зоологический институт РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: spicmaff@gmail.com*

Форма клетки при локомоции — таксоноспецифичный признак амебоидных протистов. Система морфотипов Смирнова и Гудкова упорядочивает разнообразие таких форм и используется для морфологической идентификации амеб (Smirnov, Goodkov, 1999). С развитием молекулярных методов локомоторную форму стали сопоставлять с нуклеотидными последовательностями, уточняя филогенетические взаимоотношения и границы таксонов на основе интегративного подхода (Smirnov et al., 2005). Локомоторная форма изменяется в процессе движения. Гармоники Фурье позволяют исследовать динамику контура *Amoeba proteus* (Ebata et al., 2024).

Цель работы — разработать воспроизводимый подход к выявлению и количественному описанию локомоторных форм свободноживущих амёб без предварительного распределения объектов по заданным морфотипам. Сформирован референсный набор микрофотографий с вручную размеченными контурами целых клеток. Данные разделили на тренировочную, тестовую и валидационную выборки с учётом происхождения объектов, культур и условий съёмки. Изображения подготавливали к анализу без преобразований, сохраняя размер, пропорции или контур клеток. Для выделения контуров сравнивали классический метод сегментации, Cellpose и Omnipose. Маски оценивали по совпадению с ручной разметкой, сохранению площади, периметра, удлинения, асимметрии, кривизны и выступов, а также по пропускам клеток, слиянию объектов, захвату фона и потере тонких псевдоподий. Форму описывали признаками размера, компактности, удлинения, полярности, асимметрии, выпуклости, кривизны, числа и

выраженности выступов, гармониками контура и расстояниями между формами. На устойчивых признаках строили многомерное пространство и оценивали устойчивость его структуры при исключении данных отдельных штаммов, использовании альтернативных способов описания формы и варьировании положения контура. В набор вошло 268 основных масок; для 28 объектов выполнена повторная разметка. Средний Dice для повторных разметок составил 0,925, подтверждая воспроизводимость ручного выделения контуров. В многомерном пространстве морфотипы рассматриваются как воспроизводимые области, а нестабильные объекты — как переходные или неопределённые формы. Подход может стать основой автоматизированного анализа динамики формы и дополнить молекулярную идентификацию количественными признаками.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-14-00278) с использованием оборудования ЦКП «Таксон» ЗИН РАН.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА КУРИНОГО ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА В *ESCHERICHIA COLI*

Цилиндь П.А.[1], Кулешова Ю.М.[1], Потапович М.И.[1]

1. Белорусский Государственный Университет, Минск, Беларусь

E-mail: polinacilind114@gmail.com*

Использование ветеринарного препарата на основе рекомбинантного куриного интерферона-α (ИФН-α) позволяет снизить количество применяемых антибиотиков и их накопление в продуктах птицеводства. Такой препарат, Проксиферон, производится в Республике Беларусь на основе природного гена ИФН-α, изолированного из лейкоцитов кур. Индекс адаптации его кодонов (CAI) для экспрессии в *E. coli* составляет 0,63, что приводит к низкой эффективности трансляции в бактериальной клетке. Для

увеличения интенсивности трансляции нами был сконструирован оптимизированный ген ИФН-α, с CAI равным 0,82, что позволяет прогнозировать увеличение эффективности продукции целевого белка. Синтетический ген был амплифицирован и введен в вектор pET24b(+) (Novagen, Германия). Методом кальциевой трансформации созданной конструкцией pETchiα трансформировали клетки XL1-blue. Как показал ПЦР-анализ полногеномной ДНК полученных трансформантов, гибридная плазмида pETchiα, содержащая целевой ген, стабильно поддерживается и наследуется в *E. coli*. Плазмиду pET24chiα выделяли из бактерий XL1-Blue и трансформировали ею клетки экспрессирующих штаммов *E. coli* серии BL21: Codon Plus(DE3)-RIPL, Gold (DE3), DE3, CodonPlus(DE3)/pLysS. Наличие вставки pET24chiα проверяли при помощи ПЦР-анализа тотальной ДНК полученных трансформантов со специфичными к гену *chiα* праймерами. Индукцию экспрессии синтетического *chiα* проводили по общепринятой методике с использованием IPTG в качестве индуктора. Об интенсивности накопления целевого белка судили по результатам SDS-ПААГ-электрофореза полных лизатов клеток полученных продуцентов. Проведенный денситометрический анализ экспрессирующих штаммов, несущих векторную конструкцию pET24chiα показал, что штаммы на основе Codon Plus(DE3)-RIPL способны синтезировать до 3,8 % целевого белка от общего пула белков клетки, Gold (DE3) — до 12,7 %, DE3 — до 10,5 %, Codon Plus(DE3)/pLysS — до 2,5 %. Таким образом, нами произведено клонирование синтетического гена куриного ИФН-α в составе вектора pET24b(+) под контролем промотора бактериофага T7. Созданная конструкция стабильно поддерживается в клетках XL1- blue. Получены экспрессирующие штаммы, стабильно наследующие созданную гибридную конструкцию pET24chiα. Установлено, что наиболее высокие показатели уровня продукции рекомбинантного белка куриного интерферона chiα характерны для штамма BL21- Gold (DE3).

НОВЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ОТРЯДА MYCAMOEBIDA

Чикадзе Е.Д.[1*], Кулишкин Н.С.[1], Мезенцев Е.С.[1]

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

E-mail: lizapetrova842@gmail.com*

Мелкие амебы (менее 20 мкм) — одна из слабо изученных областей разнообразия лобозных амеб. Таких амеб обычно сложно обнаружить и культивировать, но их последовательности гена 18S рРНК часто образуют дискретные ветви на филогенетических деревьях. Одним из примеров такой группы является отряд Mycamoebida. Последовательности гена 18S рРНК первых известных представителей сформировали кладу близкую к Dermamoebida, в связи с чем группа получила неофициальное название «Microdermamoebida». Сейчас в состав Mycamoebida включают три рода мелких амеб. Общих морфологических черт у представителей отряда не описано; амеб этой группы можно отнести к языковидному и ланцетовидному морфотипам, сходным с Dermamoebida, но они отличаются отсутствием толстых сложных покровов.

Из проб верхнего слоя донных осадков из антропогенного пруда одного из парков города Сямынь (Китай) нами был изолирован и установлен в клональную культуру штамм мелких амеб (около 13 мкм), получивший название «Кроха». Морфологически амебы нового штамма были похожи на представителей родов *Dermamoeba* и *Paradermamoeba*, но они были значительно меньше, чем все известные представители этих родов. Поэтому изолированный штамм был предположительно отнесен к группе Mycamoebida. Филогенетический анализ последовательностей гена 18S рРНК показал, что последовательности нашего штамма образовали единую кладу с последовательностями представителей рода *Mycamoeba*. Сравнительный анализ последовательностей штамма Кроха и штамма LKM74 — первого изученного представителя этой группы — не выявил значительных отличий. Это позволяет

утверждать, что нам удалось реизолировать первого изученного представителя группы “Microdermamoebida”.

Однако достоверно отнести изученный штамм к роду *Mycamoeba* нельзя. Диагноз *Mycamoeba* содержит описание сложного жизненного цикла, который мы никогда не наблюдали в культуре исследуемого штамма. Таким образом, штамм Кроха может выступить материалом для описания нового рода, либо для пересмотра диагноза рода *Mycamoeba*. Для полного описания и сравнения нами были получены ультраструктурные данные, свидетельствующие об отсутствии сложно организованных покровов у изученного штамма.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 23-74-00050) с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Культивирование микроорганизмов» Научного парка СПбГУ.

МОРФОЛОГИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ КЛОНА ИНФУЗОРИЙ ACIN-1Z (PLEUROSTOMATIDA) ИЗ МАЛКИНСКИХ ТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ КАМЧАТКИ

Яльцев Г.С.[1,2*], Загумённый Д.Г.[1], Тихоненков Д.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт биологии внутренних вод имени И.Д. Папанина РАН», Борок, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Рязанский государственный университет имени С.А. Есенина», Рязань, Россия*

E-mail: glebyaltsev@yandex.ru*

Гидротермальные экосистемы Камчатки остаются слабо изученными в отношении разнообразия гетеротрофных протистов, что создает предпосылки для обнаружения базальных и реликтовых линий микроэукариот. Инфузории отряда Pleurostomatida Schewiakoff, 1896 (класс Litostomatea) широко распространены в пресноводных экосистемах, и являются одним из важнейших компонентов трофических сетей. При этом систематика и филогенетические отношения внутри семейства Litonotidae Kent, 1882 до сих пор не прояснены окончательно из-за дефицита молекулярно-генетических данных.

Из придонной пробы, отобранной в зоне охлаждения термального озерца (Малкинские источники, Камчатка, Россия), был изолирован клон инфузорий Acin-1Z. Морфологический анализ проведен с помощью световой микроскопии. Выполнены секвенирование гена 18S рРНК и филогенетический анализ методами максимального правдоподобия (ML, IQ-TREE) и байесовского анализа (BI, MrBayes).

Клетки изолированного клона ланцетовидной формы. Цитостом расположен апикально со смещением влево и окружен ресничным венчиком. В центральной части клетки расположены два овальных макронуклеуса, на каудальном конце — сократительная вакуоль.

Длина клеток (n = 60) составляет 36,5 (33,5–41,8; 27,2–56,8) мкм, ширина — 10,4 (9,7–11,3; 7,3–15,0) мкм (данные приведены как Me

(Q1–Q3; Min–Max)). Морфологически клон сходен с видами *Acineria uncinata* и *Amphileptiscus shii*, дифференцируемыми по числу перioральных кинет (три у *Acineria* и две у *Amphileptiscus*).

По данным филогенетического анализа гена 18S рРНК, клон Acin-1Z занимает базальное положение по отношению к семейству Litonotidae (ML = 86%, BPP = 0.99). Отсутствие известных нуклеотидных последовательностей для *A. uncinata* и *A. shii* не позволяет провести их прямой молекулярно-генетический сравнительный анализ. Полученная топология свидетельствует о принадлежности данного клона к обособленной эволюционной линии за рамками Litonotidae *sensu stricto*.

Изолированный клон Acin-1Z представляет интерес для систематики Litostomatea. Анализ инфрацилиатуры (метод протаргола) позволит окончательно определить его таксономический статус: в случае морфологического сходства с *A. uncinata* или *A. shii* потребуется ревизия этих родов, а при обнаружении уникального строения инфрацилиатуры — описание нового таксона высокого ранга. Для верификации статуса клона также планируется секвенирование региона ITS1-5.8S-ITS2.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-14-00261).

Нейробиология и нейрофизиология

ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА 5-HT7 РЕЦЕПТОРА В АСТРОЦИТАХ ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ НА ПОВЕДЕНИЕ И ФАКТОРЫ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ В СРЕДНЕМ МОЗГЕ У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Орешко А.[1*], Родный А.[1], Науменко В.[1], Базовкина Д.[1]

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

E-mail: ShaburovaAS@bionet.nsc.ru*

Длительная алкоголизация приводит к расстройствам поведения, нарушению регуляции ключевых элементов нейропластичности: серотониновой (5-HT) системы мозга и нейротрофического фактора мозга BDNF. Изменения функций астроцитарных рецепторов 5-HT7, участвующих в поддержании нормальной нейрональной активности, могут влиять на развитие алкогольной зависимости.

В работе исследовали эффекты введения во фронтальную кору вирусного конструкта «AAV_GFAP_HTR7_TdTomato», вызывающего сверхэкспрессию гена 5-HT7 рецептора в астроцитах, на а) поведение в стандартной батарее тестов, б) метаболизм серотонина методом ВЭЖХ) и в) экспрессию генов 5-HT системы, BDNF и его рецепторов методом ОТ-ПЦР реального времени в среднем мозге мышей линии C57BL/6 при длительном потреблении 10% этанола через 6 недель после введения конструкта.

Введение вирусного конструкта во фронтальную кору привело к повышению экспрессии гена 5-HT7 рецептора в этой структуре у животных как на фоне потребления этанола, так и без него ($p<0,0001$). В тесте «подвешивание за хвост» алкоголизация снизила время депрессивноподобной неподвижности у мышей, не получивших конструкт с целевым геном ($p=0.0463$), но увеличила этот показатель у мышей со сверхэкспрессией гена Htr7 ($p=0.0446$). Также сверхэкспрессия гена Htr7 увеличила время неподвижности в этом тесте у мышей, пивших этанол ($p=0.0213$). Также сверхэкспрессия снизила уровень мРНК гена 5-HT7 рецептора в

среднем мозге у мышей, пивших воду (p= 0,0059), а алкоголизация, наоборот, повысила (p=0,0029) этот уровень у мышей с конструктом целевого гена. В среднем мозге наблюдалось увеличение серотонина при алкоголизации (p= 0,0333) у мышей с конструктом гена 5-HT7 рецептора, также сверхэкспрессия повлияла на увеличение (p=0,0212) серотонина в группе мышей, получавших этанол. Нами было обнаружено увеличение (p=0,0181) уровня мРНК гена Bdnf под действием сверхэкспрессии у алкоголизированных мышей. Уровень гена TrkB рецептора увеличился в среднем мозге как при алкоголизации (p= 0,0023), так и при сверхэкспрессии (p=0,0003).
Таким образом, введение во фронтальную кору конструкта, вызывающего сверхэкспрессию гена 5-HT7 рецептора в астроцитах, усилило депрессивноподобное поведение у мышей, получавших этанол, что сопровождалось повышением концентрации 5-HT и экспрессии гена TrkB рецептора в среднем мозге этих животных. Дальнейшие исследования позволят уточнить механизмы действия алкоголя на функции астроцитов и развития депрессивных расстройств.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-75-00087).

ПРИМЕНЕНИЕ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО АЛГОРИТМА АНАЛИЗА 3D-МОРФОЛОГИИ МИКРОГЛИИ НА КОНФОКАЛЬНЫХ СРЕЗАХ ДЛЯ АНАЛИЗА МЯГКОГО НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ВЛИЯНИЯ ПЕПТИДОВ SEMAX, PGP и АСТН(6-9) ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ У МЫШЕЙ

Алексеев В.И.[1,2,*], Кислухина Е.Н.[2], Лизунова Н.В.[2], Климова М.В.[1], Гринькина А.А.[3], Бакаева З.В.[2,4,5]

1. *ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет, кафедра клеточной биологии и гистологии, Москва, Россия*
2. *ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, Москва, Россия*
3. *ФГАОУ ВО «РНИМУ имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия*
4. *ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия*
5. *ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет имени Б.Б. Городовикова», Элиста, Россия*

E-mail: slava.slava.aleks@yandex.ru*

Введение. Ишемический инсульт ведёт к гибели нервных клеток путём первичного некроза и вторичного повреждения, в том числе, вследствие нейровоспаления, ключевую роль в котором играет микроглия.

Цель. Разработать и апробировать автоматический протокол 3D-морфометрии микроглии для экспериментальной оценки активности пептидов АСТН(6–9), PGP и Semax после фототромботического инсульта у мышей.

Материалы и методы. Инсульт у мышей C57BL/6 (n = 34) вызывали методом фототромбоза, после чего в течение 3 суток интраназально вводили Semax, АСТН(6-9), PGP либо воду (контроль). Морфологию клеток исследовали на конфокальных z-

сериях (250×250×20 мкм) срезов мозга, окрашенных антителами anti-Iba1 (Abclonal, Китай). Для анализа брали точку 300 мкм от края очага в ипсилатеральном полушарии и симметричную ей в контралатеральном. Созданный алгоритм позволил проанализировать все клетки (127-259 / срез), сомы которых полностью вошли в срез. Влияние пептидов оценивали с помощью линейных смешанных моделей с факторами «Вид пептида» и «Полушарие», а также тестов Краскел-Уоллиса и Данна.

Результаты. Количество $Iba1^+$-клеток в ипсилатеральном полушарии было выше и не различалось между группами ($p>0,05$),. Межполушарная асимметрия числа клеток $((N_{ипси}–N_{контра})/(N_{ипси}+N_{контра}))$ после введения Semax была более выраженной, чем в контроле ($p=0,0116$). Инсульт вызывал амебоидную трансформацию, что сопровождалось уменьшением объема клетки (800,6 мкм^3 (673,5–1368,1) против 1326,4 мкм^3 (1206,5–3213,3); $p<0,001$) и снижением Я/Пл-отношения (0.68 (0,62–0,99) против 1,67 (1,41–1,72); $p<0,001$) в ипсилатеральном полушарии по сравнению с контралатеральным (данные группы контроль). В группах, получавших пептиды, выраженность трансформации снижена (значимое взаимодействие факторов «Вид пептида» и «Полушарие» в соответствующих смешанных моделях, $p < 0,001$). Значимые различия между группами наблюдались в обоих полушариях. Это означает, что пептиды модулируют системный ответ, а не только локальный. Размеры очага на срезах не различались между группами ($p>0,05$).

Заключение. Нейропротекторное влияние пептидов Semax, ACTH(6-9) и PGP выражается через снижение активации микроглии.

ДОЛГОСРОЧНЫЕ ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И НЕЙРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОТВЕТ НА ХРОНИЧЕСКИЙ СТРЕСС У КРЫС С КОНТРАСТНОЙ ВОЗБУДИМОСТЬЮ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Алексеева С.А.[1*], Шалагинова И.Г.[2]

1. *Балтийский федеральный университет имени Канта, Калининград, Россия*
2. *Институт физиологии имени Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: sf240703@mail.ru*

Введение. Старение и хронический стресс – факторы риска нейродегенеративных и психических расстройств. Центральную роль в этих процессах играет нейровоспаление, которое опосредуется микроглией. P2X7-рецептор вовлечён в регуляцию провоспалительных сигнальных путей микроглии, а субъединица GluN2C NMDA-рецептора (ген *grin2c*) модулирует глутаматергическую передачу в структурах лимбической системы. Селективные линии крыс с высоким (ВП) и низким (НП) порогом возбудимости различаются по стресс-реактивности.

Цель: изучить межлинейные различия поведения, состояния микроглии и экспрессии *p2rx7* и *grin2c* у стареющих крыс (14 месяцев) в норме и после стресса, перенесённого в молодом возрасте, а также провести разведочный корреляционный анализ.

Материалы и методы. Самцы ВП (n=6) и НП (n=6) в 5 месяцев подвергались 15-дневному стрессу по Гехту. В 14 месяцев были проведены поведенческие тесты «Открытое поле» (ОП) и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), иммуногистохимический анализ Iba1+ микроглии в префронтальной коре, гиппокампе и миндалине с подсчётом клеток и CTCF, а также количественная ПЦР генов *p2rx7* и *grin2c*. Корреляционный анализ Спирмена выполнен как разведочный.

Результаты. В ОП контрольные НП характеризовались более высокой двигательной активностью, большим временем в центре и

меньшим замиранием по сравнению с ВП. Стресс приводил у НП к снижению активности и росту замирания в 14 мес, указывая на тревожно-подобное состояние; у ВП изменений не выявлено. В ПКЛ различий не обнаружено. Иммуногистохимия не выявила межгрупповых различий по числу Iba1+ клеток и CTCF. Экспрессия *grin2c* в миндалине была выше у контрольных ВП по сравнению с НП; по *p2rx7* различий не обнаружено. Корреляционный анализ выявил положительную связь экспрессии *grin2c* в гиппокампе с двигательной активностью в ОП у ВП и положительную связь экспрессии *p2rx7* в гиппокампе с двигательной активностью в ОП у НП.

Заключение. Высокая экспрессия grin2c у ВП отражает особенности глутаматергической передачи, ассоциированные с адаптивностью, а её корреляция с активностью согласуется с ролью GluN2C-рецепторов в регуляции поведения. У НП положительная связь p2rx7 с активностью согласуется с модуляцией P2X7-рецептором нейротрансмиттерных систем, однако данное наблюдение требует дальнейшего изучения. ВП устойчива к стрессу, НП – более уязвима. Выявленные паттерны формируют гипотезы о роли глутаматергической и пуринергической сигнализации в стресс-реактивности при старении.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ СТАБИЛИЗАЦИЯ РЕТРОМЕРНОГО КОМПЛЕКСА ПОТЕНЦИРУЕТ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА КИНАЗЫ LRRK2, НАПРАВЛЕННОЕ НА СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ А-СИНУКЛЕИНА В КЛЕТКАХ SH-SY5Y СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА *SNCA*

Башарова К.С.[1,2]*, Безрукова А.И.[1,2], Толмачева А.С.[1], Крапова А.[1], Емельянов А.К.[1,2], Пчелина С.Н.[1,2], Усенко Т.С.[1,2]

1. *Петербургский институт ядерной физики имени Б. П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*
2. *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: kbasharova@yandex.ru*

Болезнь Паркинсона (БП) - прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, для которого в настоящее время отсутствует нейропротекторная терапия. Одним из перспективных направлений лечения считается ингибирование обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2), кодируемой геном *LRRK2*, мутации в котором ассоциированы с развитием наследственных форм БП. Однако применение высоких доз ингибиторов LRRK2 может вызывать побочные эффекты, что обуславливает интерес к комбинированной терапии. Перспективным подходом считается сочетание ингибирования LRRK2 со стабилизацией ретромерного комплекса, ключевым компонентом которого является VPS35. Мутации в гене *VPS35* также связаны с БП, а его белковый продукт, подобно LRRK2, участвует в регуляции эндосомного транспорта. Предполагается, что одновременное воздействие на данные мишени может повысить терапевтическую эффективность и снизить необходимость применения высоких доз ингибиторов LRRK2.

Цель: оценка дозозависимого и сочетанного влияния стабилизатора ретромерного комплекса R55 и ингибитора LRRK2 MLi-2 на уровень

альфа-синуклеина, а также возможности использования R55 для потенцирования эффекта низких концентраций MLi-2.

Объектом исследования являлась клеточная линия SH-SY5Y со стабильной сверхэкспрессией гена *SNCA*, полученная методом лентивирусной трансдукции. Клетки культивировали в присутствии MLi-2 (25, 50, 100, 200 (нМ)), R55 (1, 2.5, 5, 10 (мкМ)), а также при комбинированном воздействии препаратов (50+2.5; 50+5; 100+2.5; 100+5 (нМ+мкМ)). Уровень мономерного альфа-синуклеина, его фосфорилированной формы по серину 129 (pSer129), а также гибридный альфа-синуклеин-GFP и его фосфорилированную форму (pSer129) оценивали методом вестерн-блоттинга.

Показано, что MLi-2 и R55 вызывали дозозависимое снижение уровня всех исследуемых форм α-синуклеина. Наиболее выраженный эффект наблюдался при использовании MLi-2 в концентрации 100 нМ и R55 в концентрации 5 мкМ. При комбинированном воздействии добавление R55 усиливало эффект в снижении уровня исследуемых форм альфа-синуклеина низкой концентрации MLi-2: наиболее эффективной оказалась комбинация MLi-2 (50 нМ) и R55 (2,5 мкМ).

Таким образом, фармакологическая стабилизация ретромерного комплекса с помощью R55 может потенцировать действие ингибитора LRRK2 MLi-2, что указывает на перспективность применения R55 в составе комбинированной терапии с ингибиторами LRRK2 при БП.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-25-00922).

ПОИСК ОПТИМАЛЬНОЙ ДОЗЫ ИНГИБИТОРА MTOR AZD2014 ДЛЯ АКТИВАЦИИ АУТОФАГИИ И СНИЖЕНИЯ УРОВНЯ БЕЛКА АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА

Безрукова А.И.[1,2], Башарова К.С[1,2], Скударнова Е.В.[1,2*], Емельянов А.К. [1,2], Пчелина С.Н.[1,2], Усенко Т.С.[1,2]

1. *ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова Национального исследовательского центра „Курчатовский институт», Гатчина, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: skudarnova_ekaterina@ro.ru*

Сегодня патогенез распространённого нейродегенеративного заболевания болезни Паркинсона (БП), которое характеризуется накоплением белка α-синуклеина, не известны, что диктует отсутствие нейропротекторной терапии. Ранее у пациентов с БП было выявлено нарушение mTOR-сигналинга, посредством которого может деградировать α-синуклеин в клетке через активацию аутофагии (Bezrukova et al., 2026; Moors T.E. et al., 2023; Lee M.S. et al., 2025). В недавнем исследовании *in vivo* показано, что ингибитор mTOR AZD2014 усиливает процессы аутофагии (Bensalem J., et al., 2021). Однако необходим подбор эффективной дозы малой молекулы, способствующий поддерживать баланс между активацией передачи сигналов mTOR и функций клеток, так как гипер- и гипоактивация активности mTOR может приводить к их гибели.

Цель заключалась в оценке дозозависимого влияния ингибитора киназной активности mTOR AZD2014 на уровень белков, вовлеченных в mTOR-зависимую аутофагию, и различных форм белка α-синуклеина на клеточной линии SH-SY5Y с гиперэкспрессией α-синуклеина (SH-SY5Y-αSyn).

Относительные уровни фосфорилированных форм белков mTOR (Ser2448) (p-mTOR), RPS6 (Ser235/236) (p-RPS6), TFEB (Ser211) (p-TFEB), белков Beclin-1 LC3B, p62, а также белка α-синуклеина и его фосфорилированной формы (Ser129) (p-α-синуклеин) были оценены методом вестерн-блоттинга в SH-SY5Y-αSyn в присутствии AZD2014 в концентрациях 2,5, 5, 10, 20 мкмоль в течение 24 часов.

Уровень белка p-mTOR и его основного субстрата p-RPS6 снижались в SH-SY5Y-αSyn при добавлении AZD2014 во всех исследуемых концентрациях по сравнению с клетками без ингибитора ($p<0,05$). При этом концентрация AZD2014 2,5 мкмоль приводила к снижению уровня белка p62, 5 мкмоль – к снижению уровня белков Beclin-1, p-TFEB и увеличению LC3B-II/LC3B-I, 20 мкмоль – к увеличению LC3B-II/LC3B-I по сравнению с клетками без малой молекулы ($p<0,05$). Однако только концентрация AZD2014 10 мкмоль способствовала снижению мономерного и олигомерного форм белка α-синуклеина ($p<0,05$) без изменения в уровне p-α-синуклеина ($p>0,05$) на фоне увеличения LC3B-II/LC3B-I и снижения p-TFEB ($p<0,05$) по сравнению с клеточной культурой без ингибитора.

Определена оптимальная концентрация ингибитора mTOR AZD2014, приводящая к подавлению mTOR-сигналинга и активирующая процессы аутофагии и функции лизосом, что влечет за собой снижение содержания мономерной и олигомерной форм α-синуклеина на клетках SH-SY5Y-αSyn.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-25-00920).

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ИНСУЛЬТА ПРИ ОЖИРЕНИИ: АНАЛИЗ ПОСТИНСУЛЬТНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ У МЫШЕЙ С НАРУШЕНИЕМ ЛЕПТИНОВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В МОДЕЛИ ФОТОТРОМБОЗА

Бочарников А.Д.[1,2], Абрамичева П.А.[1], Якупова Э.И.[3], Аверина О.А.[1], Григорьева О.О.[1], Приймак А.В.[1], Гармаш С.А.[1], Пермяков О.А.[1], Певзнер И.Б.[1], 4, Брезгунова А.А.[1], Андрианова Н.В.[1], Сергиев П.В.[1], Плотников Е.Ю. [1, 4]

1. *НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
2. *Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
3. *ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН», Москва, Россия*
4. *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия*

E-mail:* balex5000@yandex.ru

Известно, что ожирение и диабет ухудшают прогноз после ишемического инсульта. При моделировании окклюзии средней мозговой артерии метаболические нарушения могут влиять на размер поражения через особенности церебральной перфузии и коллатерального кровотока. Цель данной работы — оценить влияние нарушения лептиновой сигнализации на ишемическую толерантность и нейропластичность, минимизировав влияние вариабельности коллатерального кровотока с помощью модели фототромбоза участка моторной коры.

Исследование проведено на мышах дикого типа (WT) и мышах линий ob/ob (дефицит лептина) и db/db (полная инактивация всех

изоформ лептинового рецептора). Объем повреждения мозга оценивали методом МРТ на 7-е сутки. Неврологический дефицит оценивали в динамике с помощью серии тестов до операции, на 3 и на 7 сутки после моделирования инсульта. Экспрессию целевых генов анализировали в коре мозга на 10-е сутки.

Анализ МРТ-изображений мозга показал, что объем поражения при ФТ статистически не различается между группами. Это может указывать на то, что при отсутствии возможности компенсации за счет коллатерального кровотока метаболический синдром не усиливает первичное повреждение.

Оценка неврологического статуса в сенсомоторных тестах выявила методологическую особенность: из-за ожирения абсолютные показатели тестов у мутантов были искажены. Анализ относительного регресса двигательных функций продемонстрировал, что мыши db/db имеют наиболее выраженное функциональное снижение, указывающее на срыв компенсаторных механизмов.

Молекулярный анализ выявил во всех группах сходную степень активации глиоза. У мышей db/db отсутствовал подъем *Tnfα* (при одновременном высоком базальном уровне этого цитокина), что свидетельствует о дисрегуляции воспалительного ответа. Также у db/db после ФТ выявлена повышенная экспрессия *Mmp3,* увеличивающая риск нарушения ГЭБ, и резкое падение нейротрофического фактора *Bdnf*. У ob/ob выявлено менее выраженное повышение маркера макрофагов *Cd36*. Фосфорилирование Akt и ERK1/2 на 10-е сутки не демонстрировало межгрупповых отличий.

Таким образом, нарушение лептиновой сигнализации не влияет на устойчивость к первичному ишемическому повреждению, но нарушает постинсультную нейропластичность. Эти данные также подчеркивают необходимость нормализации поведенческих тестов при работе с животными с ожирением.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2025-489).

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ 4-АР-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ В ГИППОКАМПАЛЬНО-ЭНТОРИНАЛЬНОЙ СЕТИ КРЫС

Великоборец Г.С.[1*], Постникова Т.Ю.[1], Зайцев А.В. [1]

1. *ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: velikoborecz90@mail.ru*

Введение. Височная эпилепсия – наиболее частая форма фармакорезистентной судорожной патологии, основным субстратом которой является гиппокампально-энторинальная нейросеть. Процесс эпилептогенеза тесно связан с постнатальным развитием мозга. Фундаментальные перестройки сети при созревании и старении определяют качественные различия ответа на один и тот же проэпилептический стимул в разном возрасте. Однако систематических исследований возрастной динамики эпилептиформного ответа с использованием единых количественных метрик не проводилось.

Цель – выявить закономерности возрастной динамики эпилептиформной активности в гиппокампально-энторинальной сети крыс в 4-аминопиридиновой модели *in vitro*.

Методы. Эксперименты выполнены на переживающих срезах мозга, содержащих гиппокамп и энторинальную кору (ЭК), полученных от крыс Вистар четырёх возрастов (P12, P21, P60, P180). Эпилептиформную активность (ЭА) индуцировали аппликацией 4-аминопиридина (4-АР) при изменении ионного состава перфузионного раствора. Полевые потенциалы регистрировали одновременно из поля CA1 гиппокампа и глубоких слоёв ЭК в течение 60 минут. Сигналы анализировали с использованием методов оценки сложности сигнала, расчета энтропии,

рекуррентного анализа и анализа траекторий в пространстве состояний.

Результаты. Установлено, что в группе P12 ЭА в поле CA1 высокодинамична и вариабельна, а вовлечение ЭК нестабильно, что отражает незрелость баланса возбуждения и торможения и препятствует генерализации сетевой активности. К P21 функциональная сопряженность ЭК и CA1 достигает максимума: формируются длительные регулярные разряды с вовлечением всего контура. У зрелых животных (P60) ЭА становится стереотипной: разряды укорачиваются, а сетевые эпизоды теряют продолжительность и разнообразие. В группе P180 ЭА сохраняется, но возрастает автономная роль ЭК, генерирующей события независимо от поля CA1, при снижении вовлеченности гиппокампа.

Заключение. Возрастная эволюция гиппокампально-энторинальной сети характеризуется не линейным изменением мощности ЭА, а последовательной сменой паттернов патологического режима: от локальной нестабильности незрелого поля CA1 через период максимальной сетевой интеграции к зрелой стереотипности и автономности ЭК. Уязвимость мозга к эпилептогенному фактору детерминирована типом сетевой организации, доминирующей в конкретный возрастной период, что обосновывает необходимость возраст-специфического подхода к оценке судорожной готовности ткани.

КАЛЬЦИЕВАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК МОЗЖЕЧКА У МЫШЕЙ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ОДНОФОТОННОЙ МИНИАТЮРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Винокуров Е. К.[1, 2*], Маринина К.С.[1, 2], Безпрозванный И.Б. [1, 2, 3]

1. *Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*
2. *Лаборатория молекулярной нейробиологии, Институт физиологии имени И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*
3. *Медицинский университет Внутренней Монголии, Хух-Хото, Внутренняя Монголия, Китай*

E-mail: gjlazik@gmail.com*

Спиноцеребеллярная атаксия 3-го типа (SCA3) относится к наследственным нейродегенеративным заболеваниям, при которых поражение мозжечка приводит к двигательным и когнитивным нарушениям (Klockgether et al., 2019). Одним из ключевых звеньев патогенеза SCA3 считается дисфункция клеток Пуркинье, поэтому особый интерес для анализа ранних функциональных нарушений составляет *in vivo* регистрация клеточной активности. Целью работы была разработка хирургического подхода для последующей *in vivo* кальциевой визуализации активности нейронов коры мозжечка в области LS-Crus I. Важно отметить, что ранее была опубликована всего одна работа (de Groot et al., 2020) с применением однофотонного миниатюрного микроскопа (минископа) на мозжечке у мышей дикого типа (WT), однако не проводились поведенческие тесты и не были исследованы нарушения нейрональной активности при нейродегенеративных процессах.

Эксперименты проводились на мышах WT. Для предварительного подбора координат выполнялась инъекция метиленового синего в мозжечок, после чего выбраны координаты относительно брегмы – AP: -0.54, ML: -0.22, DV: -0.25. Затем по подобранным координатам

вводился аденоассоциированный вирус AAV5.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40. Через 3 недели животным имплантировалась градиентная линза (ГРИН-линза) для кальциевой визуализации, а еще через 2 недели устанавливалась опорная площадка для фиксации минископа. В результате подтверждена техническая возможность стереотаксической инъекции вируса, имплантации ГРИН-линзы и установки опорной площадки в области коры мозжечка.

Следующим этапом была инъекция специфичного для клеток Пуркинье вируса AAV2/8-PCP2/L7-GCaMP6f-WPRE-pA на мышах дикого типа. В результате удалось визуализировать активность волокон клеток Пуркинье. Далее будет проведена разработка протокола для анализа данных кальциевой визуализации с помощью метода CNMF-E. В дальнейшем метод будет применен у мышей SCA3-84Q в сочетании с поведенческими тестами на моторные и когнитивные функции. Разрабатываемый подход может стать основой для сопоставления нейрональной динамики мозжечка с поведенческим фенотипом и оценки потенциальных терапевтических агентов, направленных на коррекцию патологической активности клеток Пуркинье.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2024-548).

ДЕЗОРГАНИЗАЦИЯ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ СВЯЗАНА ЧЕРЕЗ КОМПЛЕКС STIM2-EB3 С КАЛЬЦИЕВОЙ ДИСРЕГУЛЯЦИЕЙ НА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Волкова Е.И.[1*], Раковская А.В[1,2], Пчицкая Е.И[1,2]

1. *Лаборатория анализа биомедицинских изображений и данных, ФГАОУ ВО «Санкт- Петербургский Политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Лаборатория молекулярной нейродегенерации, ФГАОУ ВО «Санкт- Петербургский Политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: volkovakatusha04@gmail.com*

Болезнь Альцгеймера (БА) – нейродегенеративное заболевание, нарушающее процессы формирования памяти. В рамках кальциевой гипотезы БА нарушение клеточного гомеостаза кальция предполагается основной причиной нейродегенерации. Эндоплазматический ретикулум (ЭР) является крупнейшим кальциевым депо клетки. В дендритных шипиках ЭР способен формировать шипиковый аппарат (ША), играющий ключевую роль в синаптической пластичности. Известно, что белки ЭР семейства STIM (stromal interaction molecule) участвуют в кальциевом сигналинге и способны взаимодействовать с микротрубочками через белки EB (end-binding). В электроневозбудимых клетках комплекс STIM1-EB1 участвует в движении ЭР. Гомолог STIM2, специфичный для зрелых дендритных шипиков, взаимодействует с белком EB3. Известно, что гиперэкспрессия мутантного STIM2, не взаимодействующего с микротрубочками, в отличие от нативного STIM2 не увеличивает долю шипиков, содержащих ЭР и ША (Rakovskaya et al., 2025).

Было выдвинуто предположение, что в гиппокампальных нейронах перемещения ЭР регулируются комплексом STIM2-EB3, а нарушения кальциевой сигнализации при БА связаны с

нарушениями в подвижности ЭР и формировании ША (Rakovskaya et al., 2026).

Для его проверки был проведен прижизненный анализ ЭР в гиппокампальных нейронах в условиях низкой амилоидной токсичности, моделирующей БА. Было показано, что при БА повышается локальная гомогенность ЭР, снижается частота включения ЭР в дендритные шипики и наблюдается перераспределение ЭР между различными типами шипиков по сравнению с контролем. Кальциевый ответ сомы на кофеин увеличивался при БА относительно контроля, аналогичный выброс из шипиков уменьшался. Размер и число включений кластеров синаптоподина – маркера ША – снижались при БА в сравнении с контролем.

Для изучения участия взаимодействия белков STIM2 и TD3 было оценено влияние их гиперэкспрессии на кальциевую сигнализацию и формирование ША в норме и при БА. Гиперэкспрессия отдельно обоих белков при БА привела к восстановлению кальциевого ответа и частоты включения ША до уровня контроля.

Из полученных данных можно сделать вывод, что взаимодействие белков STIM2-EB3 участвует в движении ЭР в гиппокампальных нейронах и регулирует кальциевый сигналинг в дендритных шипиках за счет включения в них ША. Нарушения кальциевой сигнализации при БА, таким образом, могут быть связаны с нарушениями движения ЭР, вызванными снижением экспрессии STIM2.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-74-10019).

ДЕЗОРГАНИЗАЦИЯ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ СВЯЗАНА ЧЕРЕЗ КОМПЛЕКС STIM2-EB3 С КАЛЬЦИЕВОЙ ДИСРЕГУЛЯЦИЕЙ НА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦНЕЙМЕРА

Волкова Е.И.[1*], Раковская А.В[1,2], Пчицкая Е.И[1,2]

1. *Лаборатория анализа биомедицинских изображений и данных, ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*
2. *Лаборатория молекулярной нейродегенерации, ФГАОУ ВО Санкт- Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: volkovakatusha04@gmail.com*

Болезнь Альцгеймера (БА) – нейродегенеративное заболевание, нарушающее процессы формирования памяти. В рамках кальциевой гипотезы БА нарушение клеточного гомеостаза кальция предполагается основной причиной нейродегенерации. Эндоплазматический ретикулум (ЭР) является крупнейшим кальциевым депо клетки. В дендритных шипиках ЭР способен формировать шипиковый аппарат (ША), играющий ключевую роль в синаптической пластичности. Известно, что белки ЭР семейства STIM (stromal interaction molecule) участвуют в кальциевом сигналинге и способны взаимодействовать с микротрубочками через белки EB (end-binding). В электроневозбудимых клетках комплекс STIM1-EB1 участвует в движении ЭР. Гомолог STIM2, специфичный для зрелых дендритных шипиков, взаимодействует с белком EB3. Известно, что гиперэкспрессия мутантного STIM2, не взаимодействующего с микротрубочками, в отличие от нативного STIM2 не увеличивает долю шипиков, содержащих ЭР и ША (Rakovskaya et al., 2025).

Было выдвинуто предположение, что в гиппокампальных нейронах перемещения ЭР регулируются комплексом STIM2-EB3, а нарушения кальциевой сигнализации при БА связаны с

нарушениями в подвижности ЭР и формировании ША (Rakovskaya et al., 2026).

Для его проверки был проведен прижизненный анализ ЭР в гиппокампальных нейронах в условиях низкой амилоидной токсичности, моделирующей БА. Было показано, что при БА повышается локальная гомогенность ЭР, снижается частота включения ЭР в дендритные шипики и наблюдается перераспределение ЭР между различными типами шипиков по сравнению с контролем. Кальциевый ответ сомы на кофеин увеличивался при БА относительно контроля, аналогичный выброс из шипиков уменьшался. Размер и число включений кластеров синаптоподина – маркера ША – снижались при БА в сравнении с контролем.

Для изучения участия взаимодействия белков STIM2 и EB3 было оценено влияние их гиперэкспрессии на кальциевую сигнализацию и формирование ША в норме и при БА. Гиперэкспрессия отдельно обоих белков при БА привела к восстановлению кальциевого ответа и частоты включения ША до уровня контроля.

Из полученных данных можно сделать вывод, что взаимодействие белков STIM2-EB3 участвует в движении ЭР в гиппокампальных нейронах и регулирует кальциевый сигналинг в дендритных шипкиах за счет включения в них ША. Нарушения кальциевой сигнализации при БА, таким образом, могут быть связаны с нарушениями движения ЭР, вызванными снижением экспрессии STIM2.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-74-10019).

ИНТЕГРАЦИЯ МЕТОДОВ IN SILICO И IN VIVO В ОЦЕНКЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА МЕТФОРМИНА ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У DANIO RERIO

Воронцов А. А.[1*], Романовский А. С.[2] , Ереско С. О.[1,2], Айрапетов М. И.[2]

1. *Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт - Петербург, Россия*

E-mail: 1404artemiy@gmail.com*

Введение. Алкогольное воздействие на центральную нервную систему (ЦНС) провоцирует стойкие функциональные расстройства. Для поиска эффективных нейропротекторов, таких как метформин, критически важен переход от изолированного изучения мишеней к системному анализу многокомпонентных сетей («лиганд - транспорт - мишень - сигнальный путь»). Интеграция методов in silico и биологического тест-скрининга in vivo позволяет верифицировать полифармакологические эффекты препарата на системном уровне.

Цель работы - на основе кросс-системного подхода исследовать конформационное разнообразие и характер регуляторного действия метформина на параметры двигательной активности Danio rerio.

Материалы и методы. На этапе in silico анализа из баз PubChem и DrugBank извлечены стандартизованные 2D/3D-представления метформина (CID 4091). Для оценки пространственного соответствия и энергетики связывания выполнен гибкий молекулярный докинг лиганда в активные центры ключевых белков-мишеней (включая крио-ЭМ структуру митохондриального Комплекса I, PDB: 8ZSK). Биологическая валидация проведена на половозрелых особях Danio rerio. Алкоголизацию моделировали экспозицией в 1% этаноле (20 мин). Метформин вводили в дозах 25 мг/л и 50 мг/л. Локомоторную активность регистрировали на 1-й и 10-й минутах. Виртуальный скрининг выявил выраженный кросс-системный характер действия метформина на клеточный

метаболизм. Молекулярный докинг продемонстрировал термодинамически выгодное встраивание молекулы в гидрофобный карман Комплекса I дыхательной цепи. Данный митохондриальный блок запускает энергетический стресс-ответ: падение уровня ATP, рост AMP и последующую прямую активацию сигнального пути AMPK. Активированная AMPK фосфорилирует внутриклеточные мишени, транслируя сигнал на подавление комплекса mTORC1, что ограничивает нейровоспаление и анаболический стресс клеток ЦНС. Эксперименты in vivo подтвердили теоретическую модель: применение метформина нивелировало локомоторный дефицит в обеих группах.

Выводы. Комплексный анализ подтвердил, что нейропротекторный эффект метформина реализуется через регуляторный путь AMPK/mTORC1, верифицированный методами докинга in silico и выражающийся в эффективном подавлении алкоголь-индуцированных поведенческих нарушений in vivo.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания FGWG-2025-0020 «Поиск молекулярных мишеней для фармакологического воздействия при аддиктивных и нейроэндокринных нарушениях с целью создания новых фармакологически активных веществ, действующих на рецепторы ЦНС»

ДОСТАВКА ПРОНЕЙРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ С ПОМОЩЬЮ SCAAV-ВЕКТОРОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИПСК ЧЕЛОВЕКА В НЕЙРОНЫ

Галиакберова А.А. [1,2*], Абдельнаби М.А.К.[1,3], Дашинимаев Э.Б.[1,2,3]

1. *ФГАОУ ВО «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России», Москва, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени П. Лумумбы», Москва, Россия*
3. *ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия*

E-mail: adgaliakberova@gmail.com*

Дифференцировка нейронов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека in vitro представляет значительный интерес для изучения развития нервной системы, моделирования нейродегенеративных заболеваний, а также для разработок персонализированной медицины. Существующие протоколы дифференцировки нейронов из ИПСК, хотя и успешно применяются в исследованиях, зачастую имеют различные ограничения — от длительности процесса до гетерогенности получаемых клеточных популяций. Таким образом, разработка новых подходов получения нейронов человека является весьма актуальной задачей.

Целью данной работы являлась разработка эффективного метода получения нейронов из ИПСК человека с использованием самокомплементарных аденоассоциированных вирусных (scAAV) векторов, содержащих гены пронейральных факторов транскрипции.

Разработанный протокол включает три последовательных этапа. На первом этапе одновременная трансдукция ИПСК scAAV-вектором, несущим с ген фактора ASCL1, и scAAV-вектором с геном антиапоптотического фактора BCL-XL приводит к формированию

пролиферирующих промежуточных клеток. Эти клетки демонстрируют черты, сходные с нейральными стволовыми/прогениторными клетками. Второй этап предполагает трансдукцию промежуточных клеток scAAV-вектором с геном фактора пронейрального фактора NGN2, одновременно с и scAAV-BCL-XL, что обеспечивает конверсию в нейрональные культуры. Третий этап заключается в функциональном созревании полученных нейронов.

Нейрональная природа дифференцированных клеток подтверждена методами иммуноцитохимического окрашивания и ОТ-ПЦР в реальном времени. Электрофизиологический анализ методом patch-clamp продемонстрировал функциональную зрелость полученных нейронов.

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования scAAV-векторов для доставки пронейральных факторов при дифференцировке ИПСК человека в нейроны. Дальнейшие исследования будут направлены на оптимизацию протокола для направленного получения специфических типов нейронов, включая дофаминергические и ГАМКергические популяции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-75-10029).

ВЛИЯНИЕ БЕТА-АМИЛОИДА И НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ДЛЯ ИММУННЫХ КЛЕТОК КРОВИ

Грановская Е.А.[1,2,*], Варшавская К.Б.[1], Кечко О.И.[1], Митькевич В.А.[1]

1. *ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН», Москва, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «РНИМУ имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия*

E-mail: katgranov@gmail.com*

Болезнь Альцгеймера (БА) – неизлечимое нейродегенеративное заболевание, являющееся наиболее частой причиной деменции. БА характеризуется образованием амилоидных бляшек, состоящих из бета-амилоида (Aβ), и развитием нейровоспаления (Heneka et al., 2015). Ранее считалось, что БА затрагивает только центральную нервную систему, однако последние исследования показали, что, помимо Aβ, значительный вклад в развитие нейровоспаления может давать активация периферической иммунной системы. Для пациентов с БА были показаны рост маркеров периферического воспаления, изменение профиля иммунных клеток и инфильтрация ими паренхимы головного мозга (Bettcher et al., 2021). Однако, конкретные механизмы проникновения иммунных клеток в мозг и факторы, влияющие на этот процесс, остаются не до конца изученными. Потенциальными путями для проникновения иммунных клеток через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) могут служить увеличение проницаемости барьера и/или усиление адгезии периферических иммунных клеток к эндотелию мозга. В данной работе, используя *in vitro* модель ГЭБ, мы оценили влияние Aβ и воспаления на активацию указанных путей.

Для создания модели ГЭБ эндотелиальные клетки мозга bEnd.3 сокультивировали с первичной культурой астроцитов, либо первичной культурой, содержащей все клетки мозга, на мембране transwell. Методом ИФА для всех трех культур оценивали

продукцию цитокинов IL-6 и TNFα после суточной инкубации с $Aβ_{42}$. Мы показали, что вызванная $Aβ_{42}$ продукция провоспалительных цитокинов клетками мозга усиливает проницаемость ГЭБ, при этом сам $Aβ_{42}$, в отсутствии нейровоспаления, не влиял на проницаемость монослоя bEnd.3. С использованием гемоанализатора мы установили, что у APP/PS1 мышей развитие патологии вызывает увеличение количества лейкоцитов и лимфоцитов по сравнению с мышами дикого типа (WT). Однако, степень адгезии выделенных из периферической крови иммунных клеток на bEnd.3 не отличалась между APP/PS1 и WT мышами. Предварительная обработка монослоя bEnd.3 как $Aβ_{42}$, так и провоспалительными цитокинами усиливала адгезию иммунных клеток крови на эндотелий мозга.

Таким образом, нами было показано, что индуцируемое Aβ нейровоспаление в большей степени, чем сам Aβ, способно усиливать патологию ГЭБ in vitro и, вероятно, оказывать значительное влияние на проникновение периферических иммунных клеток в паренхиму мозга.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2024-530).

ВЛИЯНИЕ НАТИВНОЙ И КОНСТИТУТИВНО СЕКРЕТИРУЕМОЙ ФОРМЫ CDNF НА УГАСАНИЕ УСЛОВНОЙ РЕАКЦИИ СТРАХА У КРЫС ЛИНИИ OXYS

Григорьева Ю. Д.[1*], Еремин Д.В., Каминская Я. П., Родный А.Я., Ильчибаева Т. И., Колосова Н. Г., Науменко В. С.

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

E-mail: grigorevaulia465@gmail.com*

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF) рассматривается как перспективная терапевтическая мишень при нейродегенеративных заболеваниях. В отличии от классических нейротрофинов, CDNF преимущественно локализуется в эндоплазматическом ретикулуме, хотя при определенных условиях способен секретироваться во внеклеточное пространство. При этом остается неясным, в какой степени его биологические эффекты зависят от внутриклеточной локализации белка. Также, несмотря на накопленные данные о нейропротекторных свойствах CDNF, его роль в регуляции процессов памяти остается недостаточно изученной. В настоящей работе исследовали влияние сверхэкспрессии нативной и конститутивно секретируемой форм CDNF на угасание условной реакции страха у крыс линии OXYS и оценивали экспрессию генов, вовлеченных в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума.

Самцам крыс линии OXYS билатерально вводили в гиппокамп аденоассоциированные вирусные векторы, экспрессирующие EGFP (контроль), нативный CDNF или модифицированный белок CDNF (mutCDNF), содержащий сигнальный пептид куриного лизоцима, обеспечивающий его конститутивную секрецию. Животных обучали в модели контекстуального обуславливания страха: в первый день предъявляли аверсивный стимул, на второй день оценивали выраженность условной реакции страха без стимула. Затем в течение еще трех дней оценивали угасание условной реакции без подкрепления. Выраженность условной реакции страха

оценивали по времени замирания. Через сутки выделяли гиппокамп и методом ПЦР в реальном времени анализировали экспрессию генов *Ire1α*, *Grp78*, *Creb1*, *Atf6*, *sXbp1*, *uXbp1*, а также отношение *sXbp1*/*uXbp1*.

Сверхэкспрессия как нативного CDNF, так и секретируемого CDNF сопровождалась выраженным снижением уровня времени замирания по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует об ускоренном угасании условной реакции страха. Анализ экспрессии исследованных генов не выявил значимых различий между группами, за исключением отношения *sXbp1/uXbp1*, которое было снижено у животных, экспрессирующих mutCDNF.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что влияние CDNF на угасание памяти страха, вероятно, не определяется его функциональным состоянием и внутриклеточной локализацией. Отсутствие выраженных изменений экспрессии большинства исследованных генов указывает на то, что наблюдаемые поведенческие эффекты не сопровождаются долговременной перестройкой транскрипционной активности компонентов UPR либо реализуются посредством иных молекулярных механизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25–15-00043).

НАРУШЕНИЕ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПРИ СОЧЕТАНИИ НЕОНАТАЛЬНОЙ МИКРОГИРИИ И ФЕБРИЛЬНЫХ СУДОРОГ

Грифлюк А.В.[1*], Постникова Т.Ю.[1], Диеспиров Г.П.[1], Гук В.А.[1], Зайцев А.В. [1]

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

E-mail: Griflyuk.Al@mail.ru*

Нарушения архитектоники коры головного мозга служат фактором риска развития эпилепсии, ранним проявлением которой часто становятся фебрильные судороги (ФС). Согласно гипотезе «второго удара», ФС могут усугублять последствия врождённых кортикальных аномалий, приводя к когнитивному дефициту, в основе которого лежит нарушение синаптической пластичности – клеточного механизма обучения и памяти.

Цель — оценить влияние изолированной микрогирии и двойной патологии (микрогирия + ФС) на долговременную потенциацию (ДВП) и морфологию гиппокампа крыс в возрасте P21 и P70.

Очаговую микрогирию моделировали у самцов крыс Вистар на первые сутки жизни (P0) методом локальной заморозки первичной соматосенсорной коры. ФС индуцировали на P10 гипертермией. Животные были разделены на три группы: контроль, изолированная микрогирия и двойная патология. На переживающих срезах гиппокампа регистрировали полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) в радиальном слое поля CA1. ДВП индуцировали высокочастотной стимуляцией (ВЧС). Использовали блокатор NMDA-рецепторов CGP37894 (5 мкМ) и коагонист D-серин (10 мкМ). NMDA-токи в пирамидных нейронах поля CA1 во время ВЧС оценивали методом пэтч-кламп. Морфологию изучали на криосрезах (20 мкм), окрашенных тионином по методу Ниссля.

На P21 у контрольных животных ВЧС вызывала выраженную ДВП: наклон пВПСП увеличивался в 1,50±0,06 раза. CGP37894 полностью блокировал ДВП, подтверждая NMDA-зависимый механизм индукции; D-серин не влиял на её величину. У крыс с микрогирией и двойной патологией ДВП была снижена до 1,22±0,05 в обеих группах, при сохранении NMDA-зависимого механизма и отсутствии эффекта D-серина. При этом снижение NMDA-токов во время ВЧС было выявлено только в группе с двойной патологией. На P70 нарушение пластичности сохранялось также только при сочетании патологий.

Морфологический анализ выявил прогрессирующую потерю нейронов в поле CA3: на P21 их число снижалось на 19% при изолированной микрогирии и на 24% при двойной патологии, к P70 — на 27% и 36% соответственно. В CA1 на P21 нейрональный дефицит наблюдался только при двойной патологии (30% от контроля) и стойко сохранялся к P70.

Таким образом, сочетание неонатальной микрогирии и ранних ФС усугубляет повреждение гиппокампа, что проявляется в прогрессирующей потере пирамидных клеток поля CA3, вовлечении в патологический процесс поля CA1 и более стойком нарушении синаптической пластичности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-15-00293).

ВКЛАД ГИПЕРТЕРМИЧЕСКИХ СУДОРОГ И НЕОНАТАЛЬНОЙ МИКРОГИРИИ В РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНЫХ СЕТЕЙ КРЫС

Гук В.А.[1], Постникова Т.Ю.[1], Зайцев А.В.[1*]

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

E-mail: aleksey_zaitsev@mail.ru*

Эпилепсия – хроническое заболевание ЦНС, часто дебютирующее в детстве и нарушающее созревание мозга. В основе кортикального развития лежит баланс возбуждения и торможения, поддерживаемый нейрон-глиальными сетями. В клинике наблюдается коморбидность фебрильных судорог (ФС) и кортикальных дисплазий у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией. Согласно гипотезе «второго удара», ФС могут усугублять последствия врождённых структурных патологий, однако клеточные механизмы их взаимодействия остаются слабо изученными.

Цель – оценить влияние неонатальной микрогирии и ФС на структурную организацию первичной соматосенсорной коры и гиппокампа крыс в возрасте 21 и 70 дней.

Работа выполнена на самцах крыс Вистар. В первые сутки после рождения (P0) моделировали микрогирию методом криодеструкции, на P10 индуцировали ФС путём гипертермического воздействия. Сформированы четыре группы: контроль, изолированная микрогирия, изолированные ФС и сочетанная патология. Проводили иммуногистохимический анализ криосрезов (20 мкм) с антителами к NeuN (нейроны), PV и CR (интернейроны), GFAP (астроциты) и Iba1 (микроглия). Визуализацию осуществляли с помощью конфокальной микроскопии. Количественную оценку плотности клеток выполняли в программе ImageJ, статистическую обработку – в Statistica 8 ($p < 0.05$).

В соматосенсорной коре у молодых крыс (P21) в группе ФС выявлено увеличение плотности нейронов в средних слоях, при

сочетанной патологии — ее снижение в поверхностных и глубоких слоях. У взрослых животных (P70) снижение нейронов в глубоких слоях коры отмечено только в группах с микрогирией. Изменений плотности интернейронов, площади, занимаемой GFAP+-астроцитами, и плотности Iba1+-микроглии в коре не обнаружено. В гиппокампе у крыс обоих возрастов ФС вызывали снижение плотности нейронов в поле CA1, микрогирия — в поле CA3, а сочетанная патология — в обоих полях. Только в группе с сочетанной патологией на P21 выявлено транзиторное снижение плотности PV+ и CR+ интернейронов в поле CA1; к P70 различия нивелировались. В поле CA3 изменений интернейронов не обнаружено. Глиальных изменений в гиппокампе также не выявлено.

Сочетанная патология вызывает наиболее выраженные структурные перестройки в гиппокампе, при этом не усугубляет нейрональный дефицит в новой коре. Транзиторный дефицит торможения в гиппокампе в критический период развития может запускать долгосрочные механизмы нарушения баланса возбуждения и торможения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-15-00293).

НАНОЧАСТИЦЫ ДОНОРНО-АКЦЕПТОРНОГО ПОЛИМЕРА ДЛЯ НЕЙРОСТИМУЛЯЦИИ В БЛИЖНЕМ ИК ДИАПАЗОНЕ

Исаева Ю.А.[1*], Благодарная Е.Д[1], Ветюгова А.А.[1], Асеев Н.А.[1,2], Лупоносов Ю.Н.[1]

1. *Институт синтетических полимерных материалов имени Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия*
2. *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

E-mail: yu.isaeva@ispm.ru*

Органические полупроводниковые наноматериалы открывают новые возможности для создания светоуправляемых биоэлектронных устройств благодаря сочетанию биосовместимости, настраиваемых оптических свойств и простоты химической модификации. Наиболее перспективными являются донорно-акцепторные сопряжённые полимеры, способные эффективно поглощать свет в красной и ближней инфракрасной (БИК) областях спектра, что обеспечивает более глубокое проникновение излучения в биологические ткани. Одной из областей применения подобных материалов является фотостимуляция нейронов. По сравнению с традиционными методами нейромодуляции, основанными на электрическом воздействии или оптогенетике, данный подход позволяет управлять активностью нервных клеток светом без имплантации устройств или генетической модификации клеток, что делает его привлекательным для разработки неинвазивных технологий.

В настоящей работе синтезирован новый донорно-акцепторный полимер P-IDIC-TF, на основе которого методом наноосаждения получены стабильные водные дисперсии наночастиц (НЧ) со средним гидродинамическим диаметром 55 нм и ζ-потенциалом −13,7 мВ. НЧ P-IDIC-TF характеризуются максимумами поглощения при 712 и 735 нм и сохраняют коллоидную стабильность в воде и буфере Хэнкса (HBSS) более десяти суток. При облучении светом с длиной волны 730 нм (100 мВт/см²) НЧ P-IDIC-TF демонстрируют

фототермическую конверсию с эффективностью η = 37% при многократных циклах нагревания и охлаждения. Исследования на первичной культуре кортикальных нейронов мыши показали, что БИК-облучение в присутствии НЧ P-IDIC-TF вызывает деполяризацию клеточных мембран, предположительно за счёт локального нагрева и активации термочувствительных ионных каналов. Полученные результаты демонстрируют перспективность соединений на основе сопряженных полимеров в качестве светоуправляемых наноактуаторов для использования в биоэлектронике и медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (ГЗ № FFSM-2024-0003).

ОСОБЕННОСТИ СУБКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ POLYQ ФРАГМЕНТА ХАНТИНГТИНА В ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ХАНТИНГТОНА

Кащеев Р.Р.[1*], Михайлова Н.А.[1], Красковская Н.А.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: mar.casheevs@gmail.com*

Болезнь Хантингтона (БХ) связана с экспансией CAG-повторов в гене *HTT*, приводящей к образованию мутантного хантингтина с удлинённым полиглутаминовым трактом. Хотя заболевание преимущественно поражает центральную нервную систему, мутантный белок экспрессируется и в периферических тканях. Поэтому дермальные фибробласты пациентов представляют доступную модель для изучения клеточных нарушений при БХ. Целью работы было охарактеризовать субклеточное распределение polyQ фрагмента хантингтина в дермальных фибробластах

пациентов с БХ и оценить его изменения при ингибировании CRM1-зависимого ядерного экспорта.

Исследовали четыре линии дермальных фибробластов пациентов с БХ (39, 42, 46 и 47 повторов polyQ) и четыре линии здоровых доноров, сопоставленные по полу и возрасту. Локализацию polyQ-положительного сигнала анализировали методом иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии на ранних и поздних пассажах. Для ингибирования CRM1-зависимого ядерного экспорта клетки обрабатывали 10 нМ лептомицином B. Дополнительно оценивали морфологию ядер и наличие многоядерных клеток.

В контрольных фибробластах на ранних пассажах polyQ-положительный сигнал преимущественно выявлялся в ядре, тогда как в линиях от пациентов с БХ отмечалось его перераспределение в цитоплазму и снижение ядерной представленности. Эти различия были наиболее выражены на поздних пассажах и варьировали между отдельными клеточными линиями. После обработки лептомицином B в обеих группах наблюдалось усиление ядерного polyQ-сигнала, что указывает на участие CRM1-зависимого экспорта в поддержании его субклеточного распределения. В культурах фибробластов пациентов с БХ также детектировались многоядерные клетки.

Таким образом, дермальные фибробласты пациентов с БХ характеризуются изменением баланса между ядерной и цитоплазматической локализацией polyQ-положительного сигнала, зависящим от пассажа и индивидуальной клеточной линии. Чувствительность фибробластов пациентов к лептомицину B свидетельствует о вовлечённости CRM1-зависимого ядерного экспорта в перераспределение сигнала и требует дальнейшего количественного анализа. Полученные результаты подтверждают применимость дермальных фибробластов для изучения ядерно-цитоплазматического транспорта при БХ.

ЭФФЕКТЫ ФЛУОКСЕТИНА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИЕЙ НА DANIO RERIO

Константинова К.С.[1, 2*], Воронцов А.А.[1, 2], Ереско С.О.[1,2], Айрапетов М. И.[1]

1. *ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail:* kksenia2211@gmail.com

Введение. Хроническая алкоголизация (ХА) формирует коморбидные тревожно-когнитивные расстройства. Флуоксетин (*FLX*) - селективный ингибитор обратного захвата серотонина. В последние годы ведутся исследования по изучению новых эффектов у соединения при различных психопатологиях. Цель работы заключалась в оценке дозозависимой эффективности *FLX* на модели ХА у *D. rerio.*

Материалы и методы. Работа выполнена на 5-ти группах рыб *D. rerio* (n=10-14): контроль, группа ХА, группа сравнения (пирацетам, 700 мг/л) и группы *FLX* (0,2 мг/л и 0,4 мг/л). Модель ХА проведена при помещении рыб в 1%-ый р-р этанола на 20 минут на протяжении 16-ти дней. После ХА помещали на 60 минут в день в р-р препарата на протяжении 14-ти дней. Поведение оценивали с помощью серии поведенческих тестов.

Результаты. После ХА было выявлены анксиогенное эффекты - пребывание рыб в верхних зонах тестового аквариума упало до 10,2±1,4 с (против 35,4±2,1 у контроля, $p<0,001$), в нижней секции выросло до 48,1±2,3 с. Локомоция снизилась до 18,4±1,2 пересечений. Терапия *FLX* 0,2 мг/л не оказала эффекта. Напротив, *FLX* 0,4 мг/л восстанавливал показатели тревожности (верхние секции 38,5±2,4 с; нижняя 22,1±1,9 с; $p<0,001$) и локомоции (26,3±1,5 пересечений). Пирацетам улучшал показатели частично. После ХА снижено социального предпочтения: время в зонах, близко расположенных к отражению (S1+S2), составило 12,5±1,6 с (у контроля 34,8±2,2 с, $p<0,01$). Флуоксетин 0,4 мг/л купировал этот

дефицит (S1+S2=32,1±2,0 с, p<0,01), тогда как доза 0,2 мг/л была неэффективной (15,3±1,7 с). Группа пирацетама не достигла контроля. В тесте «Лабиринт» после ХА выявлены когнитивные расстройства: число входов в зону награды снизилось до 1,1±0,3 (2,1±0,4 у контроля), а число переходов между секциями упало до 12,3±2,1. Терапия *FLX* в дозе 0,4 мг/л улучшила эти показатели (переходы=19,6±2,7; входы=1,7±0,3; p<0,05). Низкая доза *FLX* и препарат сравнения не обеспечили такого ноотропного эффекта.

Вывод. В эксперименте ХА индуцирует у *D. rerio* тревожные, социальные и когнитивные нарушения. Флуоксетин в дозе 0,4 мг/л обладает анксиолитическим, просоциальным и ноотропным действием.

РАЗРАБОТКА СТАБИЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ α-СИНУКЛЕИНОПАТИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ

Крышкова В.С.[1*], Пукаева Н.Е.[1], Кухарский М.С.[1]

1. *Институт физиологически активных веществ ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Россия*

E-mail: vskryshkova@gmail.com*

Патологическая агрегация α-синуклеина является одним из ключевых молекулярных механизмов болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви и некоторых других заболеваний. Поиск новых лекарственным средств с антиагрегационными свойствами требует создания воспроизводимых клеточных систем, позволяющих количественно оценивать влияние веществ на накопление белковых агрегатов. Несмотря на широкое применение моделей, основанных на транзиентной трансфекции клеток, их использование ограничено неоднородностью и временным характером экспрессии трансгена. Целью данной работы являлась разработка стабильной клеточной модели α-синуклеинопатии на

основе лентивирусной трансдукции и оценка возможности ее применения для тестирования соединений с потенциальным антиагрегационным действием.

С помощью трансдукции клеток нейробластомы SH-SY5Y лентивирусным вектором, кодирующим мутантную форму α-синуклеина A53T человека, с последующей позитивной селекцией клеток, получивших конструкт вместе с геном устойчивости к пуромицину, была получена культура клеток, стабильно экспрессирующих мутантный белок. Для индукции агрегации α-синуклеина проводилась 12-часовая инкубацию клеток с ингибитором протеасом MG132. Детекция рекомбинантного α-синуклеина в клетках выполнялась методом иммуноцитохимии. В культуре отмечалась равномерная продукция белка всеми клетками, сопровождающаяся образованием в некоторых из них характерных цитоплазматических агрегатов.

Для валидации модели было проведено тестирование ряда соединений с потенциальной нейропротекторной активностью, основанной на способности ингибировать патологическую агрегацию белков. Инкубация с производным тетрагидрокарбазола TG2113x, а также веществом сравнения бантенетапом в течении 24 часов приводила к значительному снижению количества клеток с агрегатами α-синуклеина.

Полученные данные демонстрируют, что разработанная *in vitro* модель α-синуклеинопатии (SH-SY5Y-LV-α-Syn-A53T-Pur) может рассматриваться как чувствительный инструмент для фармакологического скрининга, направленного на поиск ингибиторов агрегации α-синуклеина. Ее особенностью является умеренный уровень продукции α-синуклеина A53T, позволяющий моделировать процессы хронического накопления и агрегации мутантного белка, характерные для болезни Паркинсона.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ИФАВ РАН (FFSG-2024-0023).

ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ПИРРОЛИЛАЗИНОВ НА ЖИВОТНОЙ МОДЕЛИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Львов А.В.[1*], Михайлова Е.Р.[1], Утепова И.А.[2,3], Гужова И.В. [1], Маргулис Б.А. [1], Лазарев В.Ф.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия*
3. *ФГБУН «Институт органического синтеза имени И.Я. Постовского Уральского отделения РАН», Екатеринбург, Россия*

E-mail: lvovalex02@gmail.com*

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одним из наиболее распространённых типов травм, при этом ее частота ежегодно увеличивается. Кроме непосредственного повреждения вследствие травмы, ЧМТ часто приводит к отдаленным последствиям – вторичным повреждениям мозга, которые проявляются в виде нарушений фолдинга белков и усиленного апоптоза. Это приводит к усугублению последствий первичных повреждений, а также может в дальнейшем повышать риски возникновения нейродегенеративных заболеваний. В связи с этим актуально рассмотрение в качестве терапевтической мишени системы шаперонов, а именно Hsp70, являющегося регулятором фолдинга белков и обладающего антиапоптотическим действием. Проведенные ранее исследования соединений пирролилазинов показали, что некоторые из них обладают способностью к повышению продукции Hsp70 и имеют нейропротекторный эффект (Dutysheva et al., 2020). Согласно полученным данным, наилучший результат показало соединение КД-17, которое и было выбрано для дальнейшего анализа его нейропротекторных свойств на животной модели ЧМТ.

В ходе выполнения работы крыс разделили на 5 групп: контроль, ЧМТ контроль и три группы с введением КД-17 (1 мг/кг, 4 мг/кг, 16 мг/кг). Была проведена панель поведенческих тестов на оценку памяти и моторных функций. После проведения тестов у части животных изъяли головной мозг с дальнейшим проведением иммуногистохимического анализа (ИГХ) и конфокальной микроскопии срезов гиппокампа. У другой части были получены лизаты гиппокампа и проведена проверка на белковые агрегаты и их состав с помощью ультрафильтрации с последующей иммунодетекцией специфическими антителами.

В ходе исследования было выяснено, что введение препарата повышает двигательную активность и исследовательский интерес, а также снижает сенсомоторный дефицит у крыс с ЧМТ. Результаты ИГХ позволили выявить увеличение количества сохранных нейронов и уменьшение количества ядер с измененной морфологией у экспериментальных групп. Исследование лизатов гиппокампа на агрегаты показало снижение в них количества бета-амилоида и повышенную продукцию Hsp70. Таким образом, проведенная работа указывает на наличие нейропротекторной активности у пирролилазинов в модели *in vivo*, что обосновывает их дальнейшее изучение в качестве потенциальных средств терапии ЧМТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-45-10013).

АНАЛИЗ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ ПАТОЛОГИЙ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК В НЕЙРОНАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ХАНТИНГТОНА, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ ИПСК ПОСЛЕ НАИВНОЙ КОНВЕРСИИ В СРЕДЕ HENSM

Макеева В.С.[1*]

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

E-mail: vladamakkeeva@gmail.com*:*

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) широко используются для моделирования нейродегенеративных заболеваний, однако несут эпигенетические аберрации — следы соматической памяти и артефакты репрограммирования, — снижающие достоверность таких моделей. Особую проблему это представляет при болезни Хантингтона (БХ): патологическая экспансия CAG-повторов в первом экзоне гена HTT нарушает функционирование нейронов, прежде всего срединных шипиковых нейронов стриатума, и сопровождается прогрессирующими изменениями эпигенетических меток, нарушающими экспрессию генов репарации ДНК. Изменение профиля метилирования в регуляторных районах генов путей NER и BER снижает их экспрессию на уровне мРНК, тогда как нарушение пути MMR проявляется на белковом уровне. В совокупности дисфункция этих систем вносит вклад в накопление повреждений ДНК, соматическую нестабильность CAG-повторов и прогрессирование заболевания. Фоновые эпигенетические аберрации ИПСК способны маскировать патогенез-специфические изменения, чем объясняется существенная вариабельность результатов анализа экспрессии генов репарации в ИПСК-моделях БХ между исследовательскими группами.

Ранее было показано (Buckberry et al., 2023), что перевод ИПСК в наивное плюрипотентное состояние сопровождается деметилированием ДНК и открытием хроматина, удаляя

аберрантные для эмбриональных стволовых клеток эпигенетические метки. Однако применённый в упомянутой работе протокол может необратимо затрагивать метки импринтинга. Мы изучаем влияние наивной конверсии в среде HENSM, позволяющей минимизировать потерю меток импринтинга, на состояние профиля метилирования ИПСК, репрограммированных из двух типов соматических клеток – фибробластов и мононуклеаров крови здоровых доноров и пациентов с БХ (46 и 77 повторов CAG). Для оценки функциональных последствий коррекции эпигенома мы проводим направленную дифференцировку как ИПСК до и после наивной конверсии в срединные шипиковые нейроны стриатума. В полученных нейрональных производных методами qPCR и Western blotting анализируются изменения экспрессии генов путей NER, BER, MMR. Степень накопления повреждений ДНК определяются комплексом методов: иммунофлуоресцентным окрашиванием на маркер двунитевых разрывов γH2AX, методом ДНК-комет и TUNEL-анализом. Сравнение показателей между нейронами из праймированных и наивно конвертированных ИПСК позволит установить, в какой мере коррекция эпигенома посредством наивной конверсии обеспечивает воспроизводимость болезнь-специфических нарушений репарации ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН (проект FWNR-2025-0022).

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕТИЛРТУТИ НА МОЗЖЕЧКОВЫЕ ФУНКЦИИ И ПОВЕДЕНИЕ У МЫШЕЙ

Маринина К.С. [1,2*] Малькова Д. С[2], Безпрозванный И. Б [1,2]

1. *Лаборатория молекулярной нейробиологии, Институт физиологии имени И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*
2. *Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: ks.marinina@bk.ru*

Метилртуть (MeHg) является одним из наиболее опасных нейротоксикантов окружающей среды, способным вызывать длительные нарушения работы центральной нервной системы. Среди наиболее уязвимых к токсическому воздействию метилртути отделов головного мозга выделяется мозжечок. На это указывают характерные симптомы, такие как атаксия, нарушения движений глаз и ориентации в пространстве, типичные для мозжечковых патологий (Grandjean P. et al, 2010). Однако при нейродегенерации мозжечка также выявляются проблемы с памятью, распознаванием лиц и изменения настроения, которые являются частью мозжечкового когнитивно-аффективного синдрома – комплекса немоторных нарушений, вызванных поражением мозжечка и дисфункцией его корковых связей (Schmahmann J.D., 2019).

В настоящем исследовании была создана мышиная модель хронического воздействия низких доз MeHg для изучения электрофизиологических, морфологических и поведенческих изменений мозжечка у животных обоих полов. Так у животных обоих полов наблюдалось снижение регулярности спонтанной активности КП и ухудшение моторной координации у самцов также выявлялось уменьшение количества тонически активных КП. Количество КП в коре мозжечка было снижено у мышей обоих полов. Самки мышей с токсическим поражением демонстрировали

более рискованное поведение, патологическую сниженную тревожность, а также дефицит контекстной памяти.
Полученные результаты показывают, что хроническое воздействие низких доз MeHg вызывает комплексные нарушения структуры и функции мозжечка, приводящие к развитию моторных и немоторных расстройств. Разработанная модель позволяет изучать механизмы нейротоксичности метилртути и может быть использована для поиска подходов к коррекции нарушений, связанных с поражением мозжечка.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2024-548).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КАЛЬЦИНЕВРИН-ЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Мелентьева Д.М.[1,2*], Безпрозванный И.Б.[1,2]

1. *Институт физиологии имени И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: melenteva.dm.m@gmail.com*

Согласно кальциевой теории болезни Альцгеймера (БА), нарушение кальциевого гомеостаза в нейронах является одним из ключевых факторов развития нейродегенерации. Одним из перспективных подходов к коррекции кальциевой дисрегуляции является применение положительных аллостерических модуляторов Ca^{2+}-АТФазы эндоплазматического ретикулума SERCA PAM (Bezprozvanny et al., Biochem Biophys Res Commun, 2024). Ранее было показано, что соединение NDC-9009 оказывает выраженный нейропротекторный эффект как в культурах нейронов, так и на животных моделях болезни Альцгеймера (Gerasimov et al., J

Neurosci, 2025). Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этого эффекта, остаются недостаточно изученными.

На предыдущем этапе исследования нами были проанализированы изменения аутофагического потока в первичной культуре гиппокампальных нейронов при амилоид-индуцированной нейротоксичности. Анализ экспрессии LC3 методом Western blot и иммуноцитохимии подтвердил развитие нарушений аутофагии в экспериментальной модели и восстановление работы системы аутофагии при воздействии 1 мкМ NDC-9009. Полученные результаты позволили сформулировать гипотезу о том, что восстановление аутофагического потока является одним из ключевых механизмов нейропротекции при болезни Альцгеймера.

Кроме того, одной из наиболее вероятных мишеней нормализации кальциевого гомеостаза является CaN (кальциневрин, Ca^{2+}/кальмодулин-зависимая фосфатаза). Доказано, что её гиперактивация является характерной особенностью нейродегенеративного процесса. При этом CaN регулирует множество независимых сигнальных каскадов. На данный момент не ясна их степень значимости в реализации нейропротекторного эффекта не ясна.

В настоящей работе предложен подход, основанный на системном сравнении трех кальциневрин-зависимых стратегий: общей фармакологической блокады кальциневрина (FK506), селективного ингибирования взаимодействия кальциневрина с NFAT (VIVIT) и прямой активации аутофагии посредством гиперэкспрессии Beclin1. Сопоставление влияния данных воздействий на морфологическое состояние нейронов, аутофагический поток и функциональную активность нейрональных сетей позволит определить, какие из downstream-механизмов кальциневрина являются критическими для реализации нейропротекторного эффекта.

Такой подход позволит уточнить молекулярные механизмы действия терапевтических стратегий и определить наиболее обоснованные направления дальнейшей разработки средств терапии БА.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 075-15-2024-548 Министерства науки и высшего образования.

ВЛИЯНИЕ ИНАКТИВАЦИИ РАНЕЕ НЕИЗУЧЕННОГО ГЕНА HSPC048 НА ПРОЦЕССЫ КОРТИКОГЕНЕЗА

Митина Н.Н.[1*], Целис Суэскун Х.К. [1] Тарабыкин В.С. [1 2], Кондакова Е.В. [1 2]

1. *НИИ Нейронаук, ФГАОУВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия*
2. *Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус»,Сочи, Россия*

E-mail: turyginanatsha@yandex.ru*:*

Наследственные нарушения нейроразвития, включающие идиопатическую эпилепсию, умственную отсталость и расстройства аутистического спектра, а также различные синдромы, вызванные редкими мутациями в определенных генах или хромосомных локусах, представляют собой серьёзную медико-социальную проблему. Диагностика данных расстройств и медико-генетическое консультирование семей затрудняется тем, что молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе патологий, во многих случаях остаются неясными. Одним из генов, функция которого на данный момент не изучена, является HSPC048. Фенотип пациентов с патогенными вариантами данного гена включает задержку интеллектуального развития, микроцефалию, судороги и спастический парапарез.

В данной работе мы изучаем влияние инактивации гена HSPC048, связанного с нарушениями развития головного мозга, на процессы кортикогенеза на примере in vivo модели, созданной методом внутриутробной электропорации (IUE). Инактивация гена проводилась путем трансфекции нейрональных предшественников

коры головного мозга плазмидными конструктами, кодирующими интерферирующие РНК к гену HSPC048 на 13,5 день эмбрионального развития. Ткани для последующего гистологического анализа были получены на 15 и 17 дни гестации, а также на 21 день постнатального развития. Было установлено, что нокдаун на 13день гестации приводит к нарушению распределения мигрирующих нейронов в слоях формирующегося кортекса на 15и 17дни эмбрионального развития, нарушениям поляризации нейронов и их аномальной морфологии. Оценка пролиферации нейрональных предшественников путем окрашивания срезов антителами к маркеру пролиферации Ki67 показала, что инактивация гена приводит к задержке выхода нейронов из митотического цикла. Анализ срезов электропорированной коры на 21 день постнатального развития демонстрирует дефекты нейритогенеза. Нейроны, в которых ген HSPC048 был инактивирован, показывают увеличенную толщину дендритов и большую плотность дендритных шипиков, чем контрольные клетки. Результаты позволяют предположить важную роль изучаемого гена в процессах кортикогенеза, таких как пролиферация, поляризация и миграция нейронов. Кроме того, выраженные нарушения морфологии клеток, дефекты поляризации и дендритогенеза могут указывать на связь функции данного гена со структурой и динамикой цитоскелета.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-75-10148).

СКРИНИНГ ЛИГАНДОВ TAAR1 И TAAR5: НОВЫЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕЦЕПТОРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СЛЕДОВЫМИ АМИНАМИ

Муртазина Р.З.[1*], Нифантова Н.В.[1]

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

E-mail: ramilya.murtazina@gmail.com*

Актуальность. Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами (TAARs) – перспективные мишени для терапии психических расстройств. TAAR1 выступает негативным регулятором дофаминовой передачи, его агонисты проходят клинические испытания как антипсихотики нового поколения. TAAR5, ранее считавшийся исключительно обонятельным, идентифицирован как регулятор тревожно- и депрессивно-подобного поведения. Однако фармакологическая характеристика TAARs затруднена низкой гетерологической экспрессией, видовой специфичностью и ограниченным числом известных лигандов. Цель – поиск и характеристика новых лигандов TAAR1 и TAAR5 in vitro.

Материалы и методы. Исследование выполнено на клетках HEK293T. Активность рецепторов оценивали с помощью BRET-биосенсора EPAC (регистрация цАМФ) и системы NanoBiT (детекция взаимодействия рецептора с Gαs-белком). Проведен скрининг соединений библиотеки SigmaLOPAC1280 в отношении TAAR1 (агонизм/антагонизм) и TAAR5 (антагонизм).

Результаты. В ходе скрининга идентифицирован D3-βarr – соединение, ранее известное как положительный аллостерический модулятор рецептора тиреотропного гормона, – в качестве полного агониста TAAR1, активного в отношении обоих ортологов (EC50 hTAAR1 = 3.1 мкМ, mTAAR1 = 0.9 мкМ). Выявлены два антагониста TAAR1 – производные амилорида, специфически активные в отношении человеческого, но не мышиного рецептора. Впервые идентифицирована группа антагонистов TAAR5 среди производных

имидазола: клонидин, р-аминоклонидин и нафазолин (IC50 6.0, 11.2 и 8.4 мкМ соответственно). Все эти соединения являются также агонистами α-адренорецепторов.

Заключение. Полученные результаты расширяют инструментарий для исследования TAARs. Идентификация D3-βarr как агониста TAAR1 открывает перспективы изучения взаимодействий между эндокринной и нервной системами. Выявление антагонистов TAAR1, селективных к человеческому ортологу, предоставляет альтернативу существующему EPPTB. Обнаружение антагонистов TAAR5 среди агонистов α-адренорецепторов позволяет выдвинуть гипотезу о наличии общего фармакофора для TAAR5 и αAR и об участии TAAR5 в регуляции норадренергической передачи. Разработанные подходы и идентифицированные лиганды могут стать основой для создания новых анксиолитиков и антидепрессантов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-74-00040).

РОЛЬ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК NEAT1_1 В ОТВЕТЕ КЛЕТОК НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ НА СТРЕСС

Пукаева Н.Е.[1,2*], Овчинников Р.К.[1,2], Кухарский М.С. [1,2]

1. *ФГБУН «Институт физиологически активных веществ ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН», Черноголовка, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия*

E-mail: nadya.pukaeva@mail.ru*

NEAT1 – длинная некодирующая РНК (днРНК), изменение уровня экспрессии которой обнаруживается при нейродегенеративных заболеваниях и психических расстройствах, причем в большинстве случаев наблюдается повышение ее уровня в головном мозге пациентов с данными заболеваниями. Роль такого повышения остается неясной, неизвестно играет ли NEAT1 повреждающую или защитную роль при развитии заболеваний. Мы предполагаем, что NEAT1 выполняет функции тонкой настройки работы ЦНС в условиях биологически значимых стимулов на организменном уровне. Это согласуется с общими представлениями о том, что NEAT1 является стресс-регулируемой РНК на клеточном уровне.

Целью данной работы была оценка влияния повышенного уровня короткой изоформы NEAT1_1 на функциональные изменения в работе нервной системы и выживаемость нейрональных культур при стрессе.

У трансгенных мышей NEAT1_1Tg, отсутствовал ярко выраженный неврологический фенотип. В то же время у них наблюдалось снижение уровня тревожности и нарушения формирования долговременной памяти. Эти изменения сопровождались дифференциальной экспрессией генов (ДЭГ), участвующих в нейрональной пластичности, включая ген нейротрофического фактора мозга Bdnf. Также NEAT1_1Tg мыши были менее подвержены развитию депрессивно-подобного поведения после

моделирования хронического стресса иммобилизации. Оценка выживаемости и апоптотической гибели клеток первичных культур, показала, что повышенный уровень NEAT1_1 имел патогенетическое значение при развитии ЭПР-стресса и теплового шока. Тогда как при репликативном и оксидативном стрессах количество гибнущих клеток было значимо ниже в NEAT1_1 культурах в сравнении с контрольными. Анализ экспрессии генов сигнальных путей показал, что в NEAT1_1 культурах изменено развитие клеточного ответа на стресс и активацию апоптоза: при ЭПР-стрессе снижена активация гена *Ddit3* (Chop), а также генов ингибиторов апоптоза *Bcl2l2, Mcl1*. В первичных нейронах NEAT1_1 специфически ингибировал агрегацию патогенной формы TDP-43, но не влиял на агрегацию мутантного FUS. Таким образом днРНК NEAT1_1 человека в нервной системе мышей приводит к изменению экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию процессов, связанных с нейрональной пластичностью, что сопровождается нарушениями функций нервной системы, в частности формированием памяти. NEAT1_1 по-разному влияет на выживаемость клеток в зависимости от типа стресса: играет негативную или протекторную роль.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИФАВ (тема № FFSG-2024-0023).

РОЛЬ STIM2 В ПОДДЕРЖАНИИ ЛОКАЛИЗАЦИИ ШИПИКОВОГО АППАРАТА В ДЕНДРИТНЫХ ШИПИКАХ ПРИ АМИЛОИДНОЙ ТОКСИЧНОСТИ

Раковская А.В[1,2*], Волкова Е.И.[2], Устинова А.Р.[2], Пчицкая Е.И[1,2]

1. *Лаборатория молекулярной нейродегенерации, ФГАОУ ВО «Санкт- Петербургский Политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Лаборатория анализа биомедицинских изображений и данных, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: jonatepl@gmail.com*

Дендритные шипики являются специализированными постсинаптичесми структурами возбуждающих синапсов. Важной органеллой зрелых шипиков является шипиковый аппарат — специализированная форма эндоплазматического ретикулума (ЭР), обеспечивающая локальную регуляцию кальциевого гомеостаза. Маркером шипикового аппарата служит актин-связывающий белок синаптоподин. При болезни Альцгеймера наблюдаются нарушения морфологии дендритных шипиков и синаптической пластичности (Rakovskaya et al., 2026). Ранее было показано, что экспрессия белка STIM2, ключевого регулятора входа кальция, при болезни Альцгеймера снижается, тогда как его гиперэкспрессия оказывает нейропротекторный эффект, способствуя сохранению дендритных шипиков, а также увеличению кластеров синаптоподина в физиологических условиях (Rakovskaya et al., 2025). Однако остается неизвестным, связано ли защитное действие STIM2 с сохранением организации шипикового аппарата.

Исследование выполнено на первичных культурах гиппокампальных нейронов. Болезнь Альцгеймера моделировали обработкой клеток олигомерами β-амилоида (Aβ), в части экспериментов проводили гиперэкспрессию STIM2. Синаптическую пластичность оценивали после индукции химической

долговременной потенциации (хЛТП). Для анализа локализации синаптоподина использовали иммуноокрашивание в сочетании с экспансионной микроскопией синаптоподина (Rakovskaya et al., 2024). Количественно оценивали число синаптоподин-позитивных шипиков, размеры кластеров белка и их внутрешипиковое расположение с помощью разработанного алгоритма трехмерного анализа, основанного на сегментации изображений и расчете пространственных метрик.

Воздействие Aβ сопровождалось уменьшением количества дендритных шипиков, содержащих синаптоподин, и снижением размеров его кластеров. Индукция хЛТП в контрольной культуре приводила к увеличению числа синаптоподин-позитивных шипиков, тогда как при амилоидной токсичности этот эффект был значительно ослаблен. Гиперэкспрессия STIM2 увеличивала количество шипиков, содержащих синаптоподин.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что амилоидная токсичность сопровождается нарушением распределения шипикового аппарата в дендритных шипиках, а гиперэкспрессия STIM2 способствует сохранению локализации синаптоподина в шипиках. Это позволяет предположить, что нейропротекторный эффект STIM2 может быть связан с поддержанием организации эндоплазматического ретикулума и кальциевого гомеостаза в дендритных шипиках.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-74-10019).

ВЛИЯНИЕ МЕМАНТИНА НА ПАТТЕРНЫ ПОВЕДЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С ПРЕРЫВИСТОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИЕЙ У КРЫС

Рязанов Т.А.[1, 2*], Романовский А.С.[1], Ереско С.О.[1, 2,] Айрапетов М. И.[1]

1. *ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: RTA10.1@mail.ru*

Введение. Мемантин (Memantinum, MEM) широко известен как препарат, применяемый при деменции, однако потенциал в терапии хронического алкоголизма недостаточно исследован. Являясь антагонистом NMDA-рецепторов, данный препарат может рассматриваться как нейропротектор и обладать нейромодулирующими свойствами. Существующие данные противоречивы из-за различий в протоколах введения этанола и оценки эффекта на крыс. Ключевое значение имеет поведенческий анализ, позволяющий выявить нарушения. В исследовании была проведена систематическая оценка эффектов MEM на паттерны поведения у крыс Вистар при прерывистой алкоголизации (ПА) при помощи поведенческих тестов.

Материалы и методы. Алкоголизация проходила по следующей схеме: крысам Вистар (n= 37, $m_{ср}$= 300г) вводили этанол (25%) с расчетом 4г/кг на протяжении 28 суток по схеме 2 дня алкоголь /2 дня отмена алкоголя. Когнитивные функции у крыс оценивались с помощью тестов «Открытое поле (ОП)» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) до ПА, после ПА и после курсового введения препарата по окончанию ПА вводили внутрибрюшинно MEM на протяжении 14 дней отмены алкоголя в дозах 2 мг/кг (n = 7) и 4 мг/кг (n = 7). Также была контрольная группа, не подвергавшаяся воздействию алкоголя и MEM (n=7) и группа, подвергавшаяся воздействию алкоголя и не проходившая курс

лечения (n=15). Статистический анализ выполнен в GraphPad 10.2 с использованием 2way ANOVA, критерий Тьюки–Крамера.

Результаты. В тесте ОП после ПА наблюдалось достоверное снижение двигательной активности во всех группах (на 56–78% по сравнению с базовым уровнем). После курсового введения МЕМ двигательная активность частично восстановилась: в группе 2 мг/кг — на 41%, в группе 4 мг/кг — на 15% относительно показателей сразу после ПА. В ПКЛ после ПА во всех группах отмечалось повышение тревожности (на 66–77%). Лечение МЕМ в дозе 2 мг/кг достоверно снижало тревожность на 37%, доза 4 мг/кг на 38%. Исследовательское поведение уменьшилось на 56% сразу после ПА в сравнении с контрольной группой. Лечение МЕМ в двух дозах не дало результатов

Вывод. ПА вызывает у крыс стойкий поведенческий дефицит по параметрам двигательной активности и тревожности. Введение МЕМ в дозе 2 мг/кг эффективнее восстанавливает двигательную активность, чем доза 4 мг/кг, что указывает на немонотонный характер дозовой зависимости. В свою очередь анксиолитический эффект от дозировки не зависит и в обоих случаях МЕМ проявляет выраженное действие.

ВЛИЯНИЕ ФЛУОКСЕТИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ПОВЕДЕНИЯ У ХРОНИЧЕСКИ АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ОТМЕНЫ ЭТАНОЛА

Сергеева К.М.[1, 2*], Романовский А.С.[1], Ереско С.О.[1, 3], Айрапетов М. И.[1]

1. *ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*
3. *Институт Мозга Человека имени Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail:* Kseniasergeeva1310@gmail.com

Введение. Флуоксетин (Fluoxetinum, FLX) — представитель группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина. В последние годы ведутся исследования по изучению новых эффектов у соединения, в том числе нейропротекторных, при различных психопатологиях. Представляется интересным изучить эффекты препарата в эксперименте прерывистой алкоголизации (ПА). Цель работы заключалась в оценке параметров тревожности, исследовательского поведения и двигательной активности у крыс при курсовом внутрибрюшинном введении FLX в условиях отмены ПА.

Материалы и методы. С целью моделирования ПА крысам Wistar (n = 36) с помощью зонда вводили 25%-ый р-р этанола (4 г/кг, 7 циклов — 2 дня алкоголь / 2 дня отмена алкоголя), контрольным животным (n = 36) вводили воду. По окончанию ПА вводили внутрибрюшинно FLX на протяжении 14 дней отмены алкоголя в дозах 3 мг/кг (n = 6) и 6 мг/кг (n = 7). Параметры поведения у животных оценивали с помощью тестов «Открытом поле (ОП)» и «Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ)» до ПА, после ПА и после курсового введения препарата. Статистический анализ был выполнен в GraphPad с использованием 2way ANOVA, критерий Тьюки–Крамера.

Результаты. В тесте ОП после ПА наблюдалось достоверное снижение двигательной активности во всех группах (на 56–78% по сравнению с базовым уровнем). После курсового введения FLX двигательная активность частично восстановилась: в группе 3 мг/кг — на 36%, в группе 6 мг/кг — на 66% относительно показателей сразу после ПА. В ПКЛ после ПА во всех группах отмечалось повышение тревожности (на 66–77%). Лечение FLX в дозе 6 мг/кг достоверно снижало тревожность на 55%, тогда как доза 3 мг/кг не оказывала анксиолитического эффекта. Исследовательское поведение после ПА ухудшилось во всех группах (снижение на 70–75%), при этом воздействие FLX в обеих дозах не оказало на него достоверного влияния.

Вывод. Хроническая ПА вызывает у крыс стойкое снижение двигательной и исследовательской активности, а также повышение тревожности. Курсовое введение FLX оказывает дозозависимый анксиолитический эффект и частично восстанавливает двигательную активность (в дозе 6 мг/кг), однако не корректирует нарушения исследовательского поведения.

ХРОНИЧЕСКАЯ ФИЗИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗМЕНЯЕТ БАЗАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ *LYMNAEA STAGNALIS*

Сорминский А.Д.[1*], Атнагулова А.А. [1], Дьяконова В.Е. [1], Мельникова В.И. [1]

1. *ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН», Москва, Россия*

E-mail: andy14264@gmail.com*

Регулярная физическая активность (ФА) оказывает модулирующий эффект на нервную систему (НС), однако клеточные механизмы адаптации отдельных нейронов к хронической ФА остаются малоизученными. У позвоночных ФА влияет на моноаминергические системы (Heijnen, et al., 2015), но сложность

НС затрудняет анализ их состояния на уровне идентифицированных нейронов. Недавно было показано, что в мозге мышей и НС моллюсков в ответ на ФА активируются гомологичные гены (Rozenberg et al., 2023), что говорит о схожести эффектов ФА у эволюционно отдалённых организмов, позволяя исследовать эти эффекты на объекте с более простой НС - моллюске *Lymnaea stagnalis*. У этого вида описан дофаминовый нейрон RPeD1, являющийся ключевым компонентом центрального генератора паттерна дыхания (ЦГПД), тесно связанного с локомоцией. Мы предположили, что хроническая ФА изменяет свойства дофаминергической системы, подготавливая организм к последующим нагрузкам.

Острая нагрузка приводила к увеличению частоты дыхания, снижению дофамина в педальных ганглиях на 20% ($p=0.001$), гиперполяризации RPeD1 ($p=0.016$) и подавлению его тонической активности ($p=0.007$). Двухчасовой отдых нивелировал эти изменения. Хроническая ФА (14 дней) через 24 ч давала сходные, но более стойкие эффекты: дофамин в педальных ганглиях снижался на 15% ($p=0.039$), RPeD1 был гиперполяризован ($p=0.007$) и показывал снижение частоты спайков ($p=0.002$), тогда как уровень предшественника L-DOPA не менялся, что указывает на усиление оборота дофамина. В глубокой воде длительность дыхательных актов была снижена как сразу после острой ($p=0.008$), так и через сутки после хронической нагрузки ($p=0.003$), указывая на возможную перестройку дыхательного паттерна. Экзогенный дофамин сильнее подавлял RPeD1 у тренированных животных, что может говорить об изменении чувствительности к дофамину.

Таким образом, хроническая ФА переводит транзиторные изменения дофаминовой системы, вызванные разовой нагрузкой, в стабильное новое состояние, сохраняющееся не менее суток. Потенциально это предполагает перестройку механизмов, определяющих мембранный потенциал и возбудимость RPeD1, вероятно, за счёт изменения экспрессии ионных каналов или рецепторов. Гиперполяризация RPeD1 и снижение дофамина могут

указывать на повышение готовности ЦГПД к ритмической активности при повышенной ФА. Сходство эффектов острой и хронической ФА в сочетании с их различной временной динамикой позволяет рассматривать дофаминергическую систему как ключевое звено долговременной адаптации к ФА.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-14-00147).

ВКЛАД СТРЕССА ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА В РАЗВИТИЕ НЕЙРОКОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ОГРАНИЧЕНИЯ СНА И САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА

Сошникова С.А.[1*], Пази М.Б[1], Чернышев М.В.[1], Екимова И.В.[1],

1. ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН», Санкт-Петербург, Россия

E-mail: sofya.soshnikovaa@mail.ru*

Введение: В современном обществе хроническое ограничение сна (ОС) и сахарный диабет 2 типа (СД2) приобрели характер глобальных эпидемий: дефицит сна стал нормой для значительной части работающего населения, в то время как заболеваемость СД2 неуклонно растет на фоне распространения ожирения. Эти состояния часто являются коморбидными и взаимно отягощают течение друг друга. Одной из наиболее уязвимых структур к их негативному влиянию является мезокортикальная дофаминергическая система, обеспечивающая когнитивные функции и работу пространственной рабочей памяти. Однако роль молекулярно-клеточных механизмов в патогенезе обоих заболеваний исследована недостаточно. Задачей данного исследования стояло оценить влияние изолированного и сочетанного воздействия ОС и СД2 на когнитивную дисфункцию и развитие PERK/CHOP каскада стресса эндоплазматического

ретикулума в мезокортикальной системе крыс. **Материалы и методы:** СД2 был индуцирован в возрасте 2 месяцев с применением высокожировой диеты и однократной инъекцией низкой дозы стрептозотоцина (25 мг/кг, вводимого в/б). Для создания ОС была применена модель полифазного ОС с применением орбитального шейкера (3 часа ограничения сна: 1 час восстановительного периода в течение 5 днейнепрерывно). Крысы были разделены на 4 группы: контроль (n=5), СД2 (n=5), ОС (n=5), ОС+СД2 (n=5). Для оценки пространственной рабочей памяти у крыс был применен тест «Y-образный лабиринт». После окончания периода ОС головной мозг изымали для последующего иммуногистохимического и вестерн-блот анализа. Статистический анализ данных — двухфакторный анализа ANOVA с применением post-hoc критерия Тьюки. **Результаты и заключение:** Было выявлено, что сочетанное воздействие ОС и СД2 приводит к ухудшению показателей пространственной рабочей памяти у крыс. Морфологический анализ показал, что изолированное действие ОС вызывает гибель около 20% дофаминергических нейронов в вентральной области покрышки. Нейродегенерация сопровождается активацией адаптивного каскада стресса эндоплазматического ретикулума. Дальнейшее развитие нейродегенерации в группе сочетанного воздействия ОС+СД2 по сравнению с их изолированным действием отсутствовало, хотя когнитивные функции в этой группе продолжали ухудшаться. Этот факт позволяет предположить, что при коморбидности факторов дефицит памяти обуславливается нарушениями аксональной трансмиссии или угнетением механизмов нейропластичности.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания (проект № 075-00264-26-00).

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНА CINP НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШИ

Субботин П. В. [1*], Филатьева А. Е. [1], Целис Суэскун Х.К. [1], Кустова А. О. [1] Тарабыкин В.С. [1,2], Кондакова Е. В. [1,2]

1. *Научно-исследовательский институт нейронаук Нижегородского государственного университета имени Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*
2. *Научный центр генетики и наук о жизни Научно-технологического университета «Сириус», Сочи, Россия*

E-mail: pavel7156162@gmail.com*

Врожденные пороки развития центральной нервной системы являются одним из главных вызовов медицины современности. Основными причинами таких пороков являются генетические нарушения, при этом молекулярный патогенез большинства из них остается неизученным. Актуальным направлением исследований является поиск потенциальных генов-кандидатов, ассоциированных с данными пороками развития. Одним из таких малоизученных генов, патогенные варианты которого ассоциированы с микроцефалией, является ген *CINP* (белок, взаимодействующий с циклин-зависимой киназой 2). Целью данного исследования явилось изучение влияния инактивации гена *Cinp* на распределение клеток в коре головного мозга эмбрионов мыши.

На основе системы CRISPR/Cas9 нами ранее были созданы два варианта инактивирующих ДНК конструктов pX330-hU6-Cas9, осуществляющих разрез геномной ДНК в области 2-го и 6-го экзонов. Полученные генетические конструкты были использованы для инактивации гена *Cinp* методом *in utero* электропорации в коре головного мозга эмбрионов мышей на 13-ый день эмбрионального развития. На 16-ый день гестации проводилось выделение головного мозга эмбрионов с последующим приготовлением срезов толщиной 50 мкм. Полученные образцы были иммуногистохимически

окрашены антителами против eGFP, а также флуоресцентным красителем DAPI. В дальнейшем был проведен анализ распределения трансфицированных клеток по слоям коры головного мозга.

В ходе исследования нами была создана *in vivo* мышиная модель инактивации гена *Cinp*. Показано, что нокаут *Cinp* приводит к снижению количества клеток в нижних слоях развивающейся коры головного мозга (пролиферативной зоне) и увеличению количества клеток в верхних слоях (зона дифференцированных нейронов). Данный паттерн распределения клеток позволяет предположить, что нокаут гена *Cinp* приводит к преждевременному выходу клеток-предшественников из митотического цикла с последующим запуском механизма нейрональной миграции. Для подтверждения данной гипотезы планируется проведение экспериментов по оценке влияния нокаута гена *Cinp* на скорость выхода нейрональных предшественников из клеточного цикла.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FSWR-2026-0012)

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СИНАПТОПОДИНА В ДЕНДРИТНЫХ ШИПИКАХ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА НА МЫШАХ ЛИНИИ 5xFAD

Твердохлебова В.Р.[1,2*], Раковская А.В. [1,2], Пчицкая Е.И. [1,2]

1. *Лаборатория анализа биомедицинских изображений и данных, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*
2. *Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: cafiton@mail.ru*

Дендритные шипики представляют собой специализированные постсинаптические структуры возбуждающих синапсов, участвующие в регуляции кальциевого гомеостаза. Однако до сих пор остаются недостаточно изучена регуляция кальциевого сигналинга из-за разрешающей способностью конфокальной микроскопии. Одним из механизмов, обеспечивающих внутриклеточный кальциевый гомеостаз, является депо-управляемый вход кальция, эффективность которого снижается при болезни Альцгеймера (БА) вследствие нарушения экспрессии STIM2 (Rakovskaya et al., 2026). Синаптоподин — актин-связывающий белок, ассоциированный с шипиковым аппаратом, отражающий функциональное состояние синапсов. Ранее было показано, что гиперэкспрессия STIM2 в физиологических условиях приводит к увеличению содержания синаптоподина в дендритных шипиках (Rakovskaya et al., 2025). Предполагается, что при БА нарушение распределения эндоплазматического ретикулума (ЭР) в шипиках способствует развитию кальциевого дисбаланса и синаптической дисфункции.

В культуре гиппокампальных нейронов *in vitro*, трансфецированных белком кальциевым сенсором GCaMP6f, обработка β-амилоидом сопровождалась снижением числа дендритных шипиков, содержащих синаптоподин, а также уменьшением размеров его

кластеров. Кроме того, депо-управляемый вход кальция был существенно снижен в шипиках без синаптоподина.

Для изучения изменений *in vivo* было проведено имунногистохимическое окрашивание срезов мозга мышей линии 5xFAD-M в возрасте 4, 6, 8 и 12 месяцев на белок синаптоподин и визуализировано с использованием экспансионной микроскопии, что позволило повысить пространственное разрешение и визуализировать расположение белка внутри дендритных шипиков. Предполагается, что локализация кластеров синаптоподина изменяются по мере развития заболевания. Анализ показал, что у мышей дикого типа кластеры преимущественно локализуются в грибовидных шипиках и реже — в тонких. У мышей линии 5xFAD наблюдается перераспределение синаптоподина: он сохраняется в грибовидных шипиках, но также значительно увеличивается в пеньковых. Параллельно отмечено общее снижение доли зрелых грибовидных структур — признак, ассоциированный с развитием БА. Полученные данные указывают на то, что при БА перераспределение синаптоподина в сторону менее функциональных типов шипиков отражает патологическую перестройку ЭР и может быть связано с нарушением кальциевой сигнализации, при достижении возраста манифестации заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25–74-10019).

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ СНИЖЕНИЯ АКТИВНОСТИ ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ МЫШИ, ВЫЗВАННЫЙ ЗАМЕНОЙ R278H

Терентьева Е.И.[1*], Алсаллум И.[1]

1. *ФБГНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия*

E-mail: ekaekater@gmail.com*

Тирозингидроксилаза (ТГ) – фермент, катализирующий гидроксилирование L-тирозина до L-3,4-дигидроксифенилаланина (L-DOPA) - первый и ключевой этап синтеза катехоламинов. Дефицит ТГ – наследственное нейрометаболическое заболевание человека, проявляющееся дистонией, каталепсией и кататонией различной степени тяжести (Dong H.-Y. et al., 2020). Значимость фермента подтверждается и на животных моделях – нокаут одной аллели приводит к когнитивным нарушениям у мышей, а полный нокаут оказывается летальным (Kobayashi K. et al.. 1995).

Недавно нами впервые было показано, что распространенный полиморфизм c.886C>T в гене *Th* мыши, приводящий к замене аргинина на гистидин в 278 позиции, снижает активность фермента (Alsalloum. et al, 2024).

Целью данного исследования было выяснение молекулярного механизма снижения активности ТГ, вызванного заменой R278H.

Для этого ТГ дикого типа и с заменой R278H были экспрессированы в *E. coli* и очищены с помощью афинной хроматографии. Чистота белка подтверждена методом SDS-PAGE электрофореза белков.

Было показано, что замена R278H снижает V_{max}, но не влияет на термостабильность активного центра фермента и даже повышает температуру денатурации молекулы ТГ. В то же время, замена в несколько раз снижает константу ингибирования фермента дофамином и 3,4-дигидроксифенолом. Этот результат позволяет предложить следующий механизм снижения активности фермента, вызванный заменой R278H. Продукт ТГ L-DOPA хелатирует ион железа в активном центре фермента, что вызывает его

ингибирование. С помощью моделирования 3D структуры дикого типа и мутантной форм фермента с помощью программы AlfaFold было показано, что замена изменяет пространственное расположение остатков (His331, His336 и Glu376), связывающих ион железа, что, по-видимому, снижает константу ингибирования и увеличивает интенсивность ингибирования ТГ продуктом реакции.
Линия лабораторных мышей C57BL/6 считается «золотым стандартом» для исследований в области нейрофизиологии, генетики поведения и нейродегенеративных заболеваний. Однако, как было показано, ТГ мышей этой линии отличается сниженной активностью по сравнению с ферментом дикого типа, что ставит под вопрос «стандартность» данной линии для исследований, связанных с физиологией катехоламинов. С другой стороны, линии мышей, у которых распространен вариант c.886C>T могут рассматриваться как модель состояний, связанных с дефицитом тирозингидроксилазы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-15-00078).

ВОЗРАСТ-СПЕЦИФИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ NMDA И AMPA РЕЦЕПТОРОВ В ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ КРЫС В ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОМ СОСТОЯНИИ

Терновая Е.В.[1, 2*], Надей О.В. [1]

1. *Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет имени Ж.И. Алферова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: ternovaya.e.v@gmail.com*

Депрессивное расстройство относится наиболее распространенным психическим заболеваниям, клиническая картина которого включает стойкие когнитивные дисфункции и нарушение нейровегетативной регуляции. Накопленные данные указывают на то, что ключевым звеном патогенеза заболевания является нарушение функционирования ионотропных глутаматных рецепторов. Однако подавляющее большинство работ в данной области сосредоточено на изучении отдельных субъединиц и выполнено на животных моделях одной возрастной когорты. Поэтому целью работы было исследование экспрессии генов субъединиц NMDA (*Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c*, *Grin3a*) и AMPA (*Gria1*, *Gria2*, *Gria3*) рецепторов в префронтальной коре (ПФК) крыс трех возрастных групп в депрессивно-подобном состоянии (ДПС).

ДПС моделировали с помощью процедуры хронического непредсказуемого стресса (7 недель) у самцов крыс линии Wistar трех возрастных групп: 1,5 месяца (молодые, n=10), 10 месяцев (взрослые, n=10) и 20 месяцев (пожилые, n=14). Формирование ДПС подтверждали с помощью теста предпочтения сахарозы, поведенческих тестов (принудительное плавание, «открытое поле») и измерения уровня кортикостерона в плазме крови (ИФА). Экспрессию генов рецепторов оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

К концу эксперимента у животных экспериментальной группы развивалась стойкая ангедония и состояние поведенческого отчаяния, а уровень кортикостерона был достоверно выше, чем у крыс контрольной группы, что подтвердило развитие ДПС. В ПФК молодых животных при развитии ДПС наблюдалось снижение экспрессии *Grin1*, *Grin2b*, *Grin2c* и *Gria1* на фоне повышения *Gria2*, что, вероятно, отражает компенсаторное смещение баланса в сторону Ca^{2+}-непроницаемых AMPA рецепторов. У взрослых крыс наблюдалось снижение экспрессии *Grin3a* и *Gria2*. В пожилом возрасте развитие ДПС сопровождалось повышением экспрессии *Grin2c* и *Grin3a,* а также снижением экспрессии *Gria3*. Учитывая, что утрата GluA2 ведёт к преобладанию Ca^{2+}-проницаемых AMPA рецепторов, а преобладание GluN2C- и GluN3A-содержащих NMDA рецепторов может нарушать процессы синаптической пластичности, наблюдаемые у взрослых и пожилых животных перестройки, вероятно, носят дезадаптивный характер.

Таким образом, исследование демонстрирует комплексные возраст-специфичные изменения экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в ПФК крыс при развитии ДПС, которые указывают на необходимость разработки возраст-ориентированных терапевтических стратегий.

Работа выполнена в рамках гос. задания ИЭФБ РАН (075-00263-25-00).

ВЛИЯНИЕ МИНОЦИКЛИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ИОНОТРОПНЫХ И МЕТАБОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА В МОЗГЕ КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ

Трубина А.К.[1,2], Коваленко А.А.[1*], Захарова М.В.[1], Горгуль Ю.А.[1], Зубарева О.Е.[1], Зайцев А.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: kovalenko_0911@mail.ru*

Эпилепсия является одним из наиболее распространенных неврологических заболеваний. Несмотря на наличие широкого спектра противосудорожных препаратов, до 30% пациентов с эпилепсией невосприимчивы к лечению, что требует поиска новых подходов. Перспективным направлением является перепрофилирование уже существующих лекарств. Миноциклин является потенциальным терапевтическим агентом благодаря сочетанию его фармакологических свойств: он обладает высокой способностью к проникновению через гематоэнцефалический барьер и оказывает плейотропное воздействие на процессы активации микроглии. Эффект данного препарата на глутаматергическую систему, работа которой существенно нарушается при эпилепсии, изучен недостаточно.

Целью данной работы было изучение влияние миноциклина на экспрессию генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в дорзальном гиппокампе крыс в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии.

Судороги были индуцированы у крыс самцов Wistar в возрасте 7-8 недель с помощью введения пилокарпина (в/б, 20-40 мг/кг). За сутки до пилокарпина крысам вводили раствор LiCl (в/б, 127 мг/кг), а за 1 час — метилскополамин (в/б, 1 мг/кг). Миноциклин вводили в дозе 100 мг/кг через 2 часа после пилокарпина, затем в течение недели

препарат вводили в дозе 50 мг/кг/сутки в/б. На 8 день после судорог (латентная фаза модели) проводили выделение образцов мозга для анализа методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Была исследована экспрессия генов, кодирующих субъединицы NMDA- (*Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*), AMPA- (*Gria1*, *Gria2*) и метаботропных (*Grm1*, *Grm2*, *Grm3*, *Grm5*, *Grm7*, *Grm8*) рецепторов в дорзальном гиппокампе крыс.

Выявлено снижение экспрессии генов, кодирующих все исследованные субъединицы NMDA- и AMPA-рецепторов и *Grm1*, в дорзальном гиппокампе крыс после пилокарпин-индуцированных судорог. Миноциклин не повлиял на экспрессию данных генов. Однако, в группе крыс, которым вводили миноциклин, была повышена экспрессия гена *Grm5.*

Таким образом, в ходе проведенного исследования продемонстрировано снижение экспрессии всех изучаемых генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, а также метаботропного рецептора *Grm1* в дорзальном гиппокампе крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. Миноциклин не повлиял на данные изменения, но привел к повышению экспрессии гена *Grm5*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2024-548).

НЕЙРОИНДУКТОРНАЯ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДА DJGDNF47 НА КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ

Шамадыкова Д.В.[1*], Астахова О.Г.[2], Пантелеев Д.Ю.[1], Павлова Г.В.[1 **]

1. *ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН» Минобрнауки России, Москва, Россия*
2. *ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия*

E-mail: djirgala04@gmail.com*

** lkorochkin@mail.ru*

Болезнь Паркинсона (БП) характеризуется гибелью дофаминергических нейронов, и так как современная терапия симптоматическая, поэтому актуален поиск патогенетических подходов. Глиальный нейротрофический фактор (GDNF) является мощным нейропротектором, однако его клиническое применение ограничено из-за неспособности проникать через гематоэнцефалический барьер и низкой диффузии в ткани мозга, что делает перспективным поиск малых биоактивных изоформ GDNF. В настоящей работе проведена комплексная оценка физиологических свойств недавно идентифицированной изоформы – пептида djGDNF47 (молекулярная масса 5,2 кДа). Изучено его влияние на нейрональную дифференцировку и выживаемость клеток на моделях *in vitro*, что позволяет оценить перспективность djGDNF47 в контексте терапии нейродегенеративных заболеваний.

Нейроиндукторную активность изучали на клетках PC12 и первичных нейронах гиппокампа крыс, культивированных с пептидом в диапазоне концентраций 0–200 нг/мл и последующей микроскопией в динамике (PC12 – на 0, 1, 3, 5 и 7 сутки; гиппокамп – на 14 сутки с окрашиванием на MAP2 и DAPI). Количественный анализ ветвления нейритов выполняли с использованием автоматизированного конвейера обработки изображений на Python

(сегментация CellPose, скелетизация, удаление области сомы). Для моделирования БП *in vitro* клетки SH-SY5Y обрабатывали 1-метил-4-фенилпиридиний ($МФП^+$) (3 мМ, 48 ч) после предварительной инкубации с пептидом, жизнеспособность оценивали MTS-тестом. Экспрессию мРНК генов оценивали методом ПЦР в реальном времени

В клетках PC12 пептид djGDNF47 в концентрации 75 нг/мл через 7 суток увеличивал суммарную длину нейритов, а при нормировке на клетку наиболее выраженный эффект наблюдался на 3-и сутки. В первичных нейронах гиппокампа пептид (100 нг/мл) достоверно повышал длину MAP2-позитивных нейритов без изменения общего количества нейронов, что свидетельствует о нейроиндукторных свойствах djGDNF47, стимулирующего преимущественно морфологическую дифференцировку. На модели БП предварительная инкубация с пептидом djGDNF47 (50 нг/мл) повышала жизнеспособность SH-SY5Y, снижала экспрессию мРНК проапоптотических генов p53 и caspase-3 и повышала экспрессию антиапоптотического гена Bcl2 при неизменном соотношении Bcl2/Bax. Таким образом, djGDNF47 проявляет нейропротекторное действие, модулируя ключевые гены апоптоза, и может рассматриваться как перспективная молекула для малоинвазивной нейротрофической терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-15-00157).

РОЛЬ СЕРОТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ 7 ТИПА В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОСЕТЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ β-АМИЛОИДОЗЕ *IN VITRO*

Штырева Д.С.[1*], Марасанова Е.А. [1], Ведунова М.В. [1], Митрошина Е.В. [1]

1. ННГУ имени Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия
E-mail: shtireva.d@yandex.ru*

В здоровом мозге серотонинергическая система оказывает влияние на развитие и функционирование нейронных сетей, регулируя процессы памяти и обучения. Дисфункция рецепторов серотонина 7-го типа (HT7R) может быть ассоциирована с болезнью Альцгеймера (Brüge, Ponimaskin, Labus, 2025). 5-HT7R может рассматриваться как новая мишень для фармакологического лечения данной патологии.

Целью исследования явилось изучение модуляции активности 5-HT7-рецепторов на межклеточную передачу сигналов кальция в первичных культурах клеток гиппокампа при моделировании β-амилоидоза на различных этапах формирования сетевых структур.

Материалом исследования явились первичные культуры клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей линии C57BL/6. Активация и блокада 5-HT7R проводилась с 10 дня культивирования (10 DIV) добавлением селективного агониста LP-211 (MedChemExpress, США) в концентрации 100 нМ и селективного антагониста 5-HT7-рецепторов SB 258719 (MedChemExpress, США) в концентрации 1 мкМ соответственно. Аналогично проводилось моделирование амилоидоза добавлением β–амилоида в концентрации 3,5 мкм. Оценка коллективной кальциевой динамики осуществлялась на 14 DIV и 21 DIV с помощью флуоресцентного красителя Oregon Green BAPTA-1 AM (Invitrogen, США) с использованием конфокального микроскопа Zeiss LSM 800 (Carl Zeiss, Германия).

Показано, что на 14 DIV β–амилоид вызывает достоверное увеличение частоты кальциевых осцилляций относительно всех экспериментальных групп. Блокада 5-HT7R на 14 DIV приводит к

достоверному повышению уровня корреляции активности между соседними клетками культуры относительно всех групп, а хроническая активация сохраняет основные параметры активности сети на уровне интактной культуры. На 21 DIV наблюдалось существенное негативное влияние β–амилоида на ключевые параметры динамики кальция по сравнению с показателями в норме, включая достоверное снижение корреляции активности между клетками, числа активных клеток, вовлеченных в сетевые процессы, и частоты осцилляций. Хроническая активация 5-HT7R агонистом LP-211 на 21 DIV предотвращает индуцированное амилоидозом снижение скорости передачи кальциевого сигнала в нейрон-глиальной сети. Большинство характеристик кальциевой динамики при хронической блокаде 5-HT7–рецепторов на 21 DIV не отличались от значений группы с хроническим амилоидозом. Таким образом, хроническая гиперактивация вызывает декомпенсацию и снижение функциональной активности сети.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №22-15-00178-п).

Молекулярные механизмы онкогенеза и современные методы противоопухолевой терапии

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПИЛЛАР[5]АРЕНОВ, ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ ТРИАЗОЛЬНЫМИ ОСТАТКАМИ

Алексанян Н.Л.[1*], Шурпик Д.Н.[2]

1. *ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Химический институт имени А. М. Бутлерова, Казань, Россия*

E-mail: nelli.aleksanyan.00@mail.ru*

Поиск новых терапевтических систем является одной из приоритетных задач медицины, так как классическая терапия может быть ограничена низкой биодоступностью и селективностью действия препаратов. Эти факторы указывают на потребность в создании соединений-носителей, способных улучшить целевые свойства лекарственных агентов. Пиллар[н]арены – супрамолекулярные системы, способные к взаимодействию рецептор-лиганд. Это симметричные соединения столбчатой формы с богатой электронами гидрофобной полостью, что обеспечивает их сродство с молекулами-гостями и делает из них превосходных кандидатов для адресной и стимул-зависимой доставки лекарственных средств. По ободу макроцикл может быть функционализирован различными заместителями, включая триазолы – стабильные азотсодержащие гетероциклы, которые не гидролизуются в биологических средах и способны активно участвовать в образовании водородных связей с биомишенями.

Была охарактеризована способность пиллар[5]аренов, функционализированных 1,2,3-триазольными и 1,2,4-триазольными заместителями ингибировать жизнеспособность клеток аденокарциномы лёгкого человека A549. Установлено, что макроциклы не обладали значимой цитотоксичностью в диапазоне концентраций 0.3125 мг/мл – 5 мг/мл.

Таким образом, отсутствие выраженной токсичности у исследованных пиллар[5]аренов подтверждает их биосовместимость, что в сочетании со способностью к эффективному инкапсулированию и селективному высвобождению молекул-гостей делает их перспективными материалами для дальнейших биомедицинских разработок как потенциальных носителей лекарственных агентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-73-10176).

КЛОНИРОВАНИЕ И СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОЙ БИБЛИОТЕКИ PP2C ФОСФАТАЗ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИХ РОЛИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

Архангельская Ю.Н.[1,2*], Симоненко С.Ю.[3], Богданова Д.А.[3], Пухальская Т.В.[1,3], Демидов О.Н..[1,3].

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «РГПУ имени А. И. Герцена», Санкт-Петербург, Россия*
3. *АНОО ВО Научно технологический университет «Сириус», Сириус, Россия*

E-mail: yu.byol.ro@gmail.com*

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — агрессивное заболевание с высокой частотой рецидивов, обусловленных развитием лекарственной резистентности. Несмотря на внедрение таргетных препаратов, пятилетняя выживаемость пациентов остаётся неудовлетворительной, особенно в группах людей пожилого возраста. Ключевым механизмом резистентности является дерегуляция сигнальных путей, контролирующих ответ на повреждение ДНК (DDR) и апоптоз. Серин/треониновые фосфатазы

семейства PP2C функционируют как негативные регуляторы DDR, дефосфорилируя ключевые белки стресс-ответа — p53, p38 MAPK, ATM, ATR, Chk1 и Chk2. Наибольшее внимание исследователей в контексте гемобластозов привлекает фосфатаза PPM1D (Wip1), активирующие мутации и гиперэкспрессия которой ассоциированы с клональной эволюцией, формированием резистентности к химиотерапии и неблагоприятным прогнозом при ОМЛ.

Однако данные последних лет свидетельствуют, что и другие представители семейства PP2C также вовлечены в патогенез миелоидных неоплазий. Особый интерес представляет их потенциальная роль в регуляции воспалительного микроокружения костного мозга, что способствует выживанию лейкемических стволовых клеток и формирование иммуносупрессивной ниши при ОМЛ.

Таким образом, изучение всего семейства PP2C фосфатаз, а не только PPM1D, представляет собой актуальную задачу. Выяснение роли PP2C фосфотаз в патогенезе ОМЛ и их связи с воспалительным сигналингом и DDR может привести к идентификации новых прогностических маркеров и терапевтических мишеней для преодоления лекарственной резистентности.

Цель работы: получить конструкции, кодирующие фосфатазы PPM1H, ILKAP для создания библиотеки PP2C фосфатаз и дальнейшей характеризации их роли в патогенезе ОМЛ.

Методы: кодирующие последовательности генов ILKAP и PPM1H амплифицировали из плазмидных векторов с использованием специфических праймеров. ПЦР-продукты и экспрессионный вектор pTracer-CMV/BSD гидролизовали рестриктазой EcoRV.

Полученные фрагменты лигировали с линеаризованным вектором с помощью ДНК-лигазы фага T4. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки Escherichia coli штамма NEB-stable. Отбор позитивных клонов проводили на селективной среде с ампициллином.

Результаты: получены и верифицированы плазмидные конструкции, кодирующие фосфатазы семейства PP2C (PPM1H, ILKAP),

пригодные для дальнейшей функциональной характеризации в модели ОМЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 19-75-20128-П).

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА ПРОЯВЛЕНИЕ КЛЕТКАМИ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА ФЕНОТИПА, СВЯЗАННОГО С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ

Балантаева М.Н.[1*], Жильникова М.В.[1], Бирюков М.М.[1], Коваль О.А.[1]

1. *Институт химической биологии и фундаментальной медицины имени Д.Г. Кнорре СО РАН, Новосибирск, Россия*
E-mail: mnbalantaeva@gmail.com*

Клетки опухоли сосудистой оболочки глазного яблока – увеальной меланомы (УМ) – метастазируют преимущественно гематогенным путём. По этой причине наряду с факторами, способствующими повышению миграционной активности клеток, огромную значимость приобретают механизмы, обеспечивающие образование внутриопухолевой сосудистой сети – ангиогенез и васкулогенная мимикрия. Гипоксические внутриопухолевые условия способствуют выживанию и селекции клеток с более злокачественным фенотипом. Комплексное исследование особенностей экспрессии и продукции клетками УМ основных факторов, участвующих в ответе на гипоксию, может выявить новые молекулярные мишени для разработки терапии этого заболевания.
Мы исследовали влияние импульсной гипоксии, позволяющей воспроизвести внутриопухолевые колебания уровня кислорода *in vivo*, а также имитации гипоксии с использованием $CoCl_2$ на факторы, связанные с метастазированием УМ: продукцию клетками фактора роста эндотелия сосудов VEGF и транскрипционного фактора ZEB1, присутствие на поверхности клеток молекулы

межклеточной адгезии эндотелия VE-кадгерина и маркера раковых стволовых меланоцитов CD271, а также связь данных факторов с проявлением фенотипа васкулогенной мимикрии.

Мы показали, что импульсная гипоксия стимулирует продукцию клетками УМ фактора VEGF и белка ZEB1, описанного как индуктор эпителиально-мезенхимального перехода в клетках различных карцином. Имитация гипоксии с использованием $CoCl_2$ воспроизводит стимулирующий эффект гипоксии на продукцию VEGF, но не ZEB1 в клетках УМ. Нами впервые было показано, что в VE-кадгерин-положительных клетках УМ имитация гипоксии с использованием $CoCl_2$ стимулирует перераспределение VE-кадгерина в пользу ядерной локализации и приводит к разрушению паттернов васкулогенной мимикрии. Ядерный VE-кадгерин, вероятно, участвует в регуляции экспрессии генов, способствующих проявлению фенотипа васкулогенной мимикрии. Стимуляция $CoCl_2$ также приводит к увеличению доли клеток УМ, экспрессирующих низкоаффинный рецептор фактора роста нервов (NGFR или CD271), что свидетельствует об индукции более злокачественного фенотипа в результате активации ответа на гипоксию. Повышение уровня экспрессии генов-мишеней центральных регуляторов клеточного ответа на гипоксию – факторов HIF-α – в клетках УМ в ответ на стимуляцию $CoCl_2$ было подтверждено результатами анализа транскриптома отдельных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-14-20051).

НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ИЗОКРИПТОЛЕПИНА - ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ КАНДИДАТЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Богданов Ф.Б.[1*], Рахимов Р.Р.[2], Федоренко Н.О.[2], Хамидуллина А.И.[1,2,3], Щербаков А.М.[1,4], Ширинян В.З.[2]

1. *ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия*
2. *ФГБУН «Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН», Москва Россия*
3. *ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва, Россия*
4. *ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия*

E-mail: f.bogdanov.f@yandex.ru*

Актуальность. Поиск новых малых молекул, обладающих высокой противоопухолевой активностью и селективностью, остается одной из актуальных задач молекулярной онкологии. Производные природных алкалоидов рассматриваются в качестве перспективных молекул для создания новых противоопухолевых агентов.

Цель. Оценить противоопухолевый потенциал и механизм действия аналогов изокриптолепиновых алкалоидов в отношении различных молекулярных подтипов рака молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. Антипролиферативная активность 35 новых производных была исследована на клеточных линиях MCF-7 (ERα+), HCC1954 (HER2+) и MDA-MB-231 (трижды негативный РМЖ) методом МТТ, а также методом оценки ингибирования колониеобразования для наиболее активных соединений. Селективность оценивалась в сравнении с цитотоксичностью соединений в отношении нормальных клеток hFB-hTERT. Влияние на клеточный цикл и митохондриальный мембранный потенциал (ММП) оценивались с помощью проточной цитометрии.

Результаты. Большинство соединений проявили микромолярную антипролиферативную активность, преимущественно в отношении ERα+ клеток MCF-7. Наиболее активным оказалось соединение 2j

(IC_{50} = 0,042 мкМ), характеризующееся высокой селективностью (SI = 102,9) вследствие низкой токсичности на нормальных фибробластах. Активность 2j в отношении HCC1954 и MDA-MB-231 оказалась существенно ниже, что свидетельствует о подтип-специфическом механизме действия. Соединение 3a обладало высокой ингибирующей активностью в отношении всех исследованных клеточных линий, включая MDA-MB-231 (IC_{50} = 0,25 мкМ), демонстрируя потенциал для терапии агрессивных форм заболевания.

Оба соединения эффективно подавляли клоногенный рост опухолевых клеток при низких наномолярных концентрациях. Исследование механизмов действия показало, что 2j индуцирует остановку клеточного цикла преимущественно в S-фазе, тогда как 3a вызывает накопление клеток в фазах S/G2-M. Для обоих соединений выявлены дозозависимое снижение ММП и увеличение доли клеток subG1, что свидетельствует об активации митохондриального пути апоптоза.

Заключение. Полученные результаты позволяют рассматривать соединение 2j как перспективный кандидат для терапии люминального РМЖ, а соединение 3a – как потенциальный препарат широкого спектра действия, активный в том числе против трижды негативного РМЖ. Оба соединения позиционируются в качестве лидеров серии для дальнейших доклинических исследований.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-73-20098).

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ДИАМИНОКАРБЕНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПАЛЛАДИЯ(II) И ПЛАТИНЫ(II) В КЛЕТКАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА НЕ СВЯЗАНА СО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ С ДНК

Бредгауэр М.Д.[1,2*], Федотова К.А.[1,2], Гнедина О.О.[1], Серебрянская Т.В.[3], Кинжалов М.А.[2], Иготти М.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*
3. *Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь*

E-mail: m.bredgauer@yandex.ru*

Эффективность терапии колоректального рака (КРР) человека ДНК-повреждающим алкилирующим препаратом оксалиплатином значительно снижается из-за развития устойчивости, создавая серьезную проблему в ведении пациентов с КРР, что требует создания агентов с иными механизмами действия. Мы предлагаем новые диаминокарбеновые ациклические производные Pd(II) (Pd-ADC) (комплексы 1, 3, 35) и Pt(II) (комплексы 8 и 17) в качестве новых антипролиферативных препаратов.

Исследование выполнено на родительской линии клеток КРР HCT116 и сублинии, устойчивой к оксалиплатину. Жизнеспособность клеток оценивали методами, основанными на изменении метаболической активности (МТТ- и резазуриновый тесты) и при окраске кристаллическим фиолетовым. Взаимодействие Pt/Pd-комплексов с плазмидной ДНК pUC19 оценивали электрофоретически в 1% агарозном геле после инкубации при 37° С в течение 1-24 часов.

Показано, что мезитильные Pd/Pt производные (1 и 17, соответственно) и асимметричный Pd-ADC 35 демонстрируют более выраженный цитотоксический эффект по сравнению с

оксалиплатином. Принципиальным отличием новых соединений является их способность одинаково эффективно индуцировать гибель как чувствительных, так и устойчивых к оксалиплатину клеток HCT116. Антипролиферативный эффект трет-бутильных Pd/Pt-производных (3 и 8) выражен слабее, чем у оксалиплатина.

Взаимодействие алкилирующих агентов цисплатина и оксалиплатина с ДНК подтверждено изменением электрофоретической подвижности pUC19. При этом инкубация с pUC19 исследуемых Pt/Pd-ADC в тех же условиях не изменила ее топологию, что указывает на отсутствие прямого взаимодействия с ДНК.

Таким образом, цитотоксическое действие новых диаминокарбеновых производных Pt/Pd с мезитильным радикалом не связано с их взаимодействием с ДНК, а обусловлено иными механизмами, что кардинально отличает их от классических терапевтических препаратов на основе Pt(II) (оксалиплатин, цисплатин). Результаты обосновывают перспективность изучения данного класса соединений для поиска подходов терапии платинорезистентных опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ и Санкт-Петербургского научного фонда (проект № 25-13-20028).

РАЗРАБОТКА БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АКТИВАТОРА Т-КЛЕТОК НА ОСНОВЕ НЕИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО СКАФФОЛДА ДЛЯ ТЕРАПИИ HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Гуменная Я.Д.[1,2*], Кукушкин И.Д.[1,2], Шипунова В.О.[1,2]

1. *НИИ Экспериментальной онкологии и канцерогенеза ФГБУ "НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина" Минздрава России, Москва, Россия*
2. *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия*

E-mail: gumennaia.iad@gmail.com*

Создание биспецифических активаторов Т-клеток является одним из перспективных направлений иммунотерапии рака. Такие конструкты способны одновременно связывать опухоль-ассоциированный антиген и рецептор на поверхности Т-лимфоцитов, тем самым перенаправляя иммунный ответ на опухолевые клетки. Большинство одобренных биспецифических молекул сконструировано на основе полноразмерных антител, что требует их наработки в эукариотических системах экспрессии и сопровождается Fc-опосредованной неспецифической активацией иммунной системы. Альтернативой может стать применение в качестве распознающих доменов неиммуноглобулиновых скаффолдов — компактных белков, характеризующихся возможностью экспрессии в бактериальных системах, высокой термодинамической стабильностью и улучшенным проникновением в опухолевую ткань.

В рамках данного исследования была разработана генетически кодируемая конструкция, включающая HER2-распознающий аффибоди $Z_{HER2:342}$, scFv, специфичный к CD3 на поверхности Т-лимфоцитов человека, и альбумин-связывающий домен, предназначенный для увеличения времени циркуляции молекулы в кровотоке. Предварительное *in silico* моделирование пространственной структуры, оптимизация условий экспрессии,

выделения и очистки позволили воспроизводимо получать целевой белок.

Специфичность взаимодействия полученного конструкта с HER2- и CD3-экспрессирующими клетками оценивали методом проточной цитометрии. Конструкт избирательно связывался как с HER2-положительными клетками EMT-HER2, так и с CD3-положительными клетками Jurkat: при концентрации 300 нМ интенсивность флуоресценции целевых клеток в 5–6 раз превышала значения для соответствующих антиген-отрицательных линий. Это подтвердило сохранение функциональной активности обоих распознающих доменов.

В присутствии PBMC человека биспецифический активатор вызывал выраженную гибель HER2-сверхэкспрессирующих клеток SKOV-Kat и обеспечивал селективное уничтожение клеток EMT-HER2. Через 48 ч при соотношении эффекторных и опухолевых клеток 5:1 доля погибших HER2-положительных клеток достигала 76% по сравнению с 24% для HER2-отрицательной линии. Таким образом, разработанный конструкт не только распознает обе молекулярные мишени, но и эффективно перенаправляет цитотоксическую активность иммунных клеток против HER2-положительных опухолевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 22-73-10141-Р).

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ Т-КАДГЕРИНА НА МОРФОГЕНЕЗ И ЭНТЕРОЦИТАРНУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА CACO-2

Гуриелидзе Л.М.[1*], Сысоева В.Ю.[1], Рубина К.А.[1]

1. *Медицинский научно-образовательный институт МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: dr.liagurieli@gmail.com*

Нарушение терминальной дифференцировки эпителиоцитов кишечника и барьерной функции играет важную роль в патогенезе колоректального рака (КРР). Т-кадгерин (CDH13) — неклассический GPI-заякоренный член суперсемейства кадгеринов, функционирующий как рецептор адипонектина и молекула клеточного отталкивания. Экспрессия Т-кадгерина часто снижена при опухолевой прогрессии, что указывает на его онкосупрессорные свойства, однако его роль в регуляции морфогенеза и дифференцировки кишечного эпителия остается недостаточно изученной. Цель работы — оценка влияния гиперэкспрессии Т-кадгерина на характер роста и динамику дифференцировки клеток аденокарциномы толстой кишки человека Caco-2 в энтероцитоподобные клетки.

Клетки Caco-2 с низким базальным уровнем Т-кадгерина подвергали лентивирусной трансдукции с последующей селекцией методом проточной цитометрии. Дифференцировку оценивали при стандартном культивировании и ускоренной индукции бутиратом натрия по активности щелочной фосфатазы (ЩФ) щеточной каемки, формирующейся в процессе дифференцировки. ОТ-ПЦР выявила в трансдуцированных клетках 600-кратное увеличение уровня мРНК Т-кадгерина. Вестерн-блоттинг подтвердил появление незрелой и зрелой форм белка. Субклеточное фракционирование показало эффективную транслокацию обеих форм Т-кадгерина в фракцию плазматической мембраны, что свидетельствует о его правильном процессинге и функциональной активности.

Гиперэкспрессия Т-кадгерина существенно изменяла фенотип клеток: культуры с гиперэкспрессией (Т+) демонстрировали повышенное распластывание и сниженную способность к островковой агрегации по сравнению с контролями (WT и GFP), склонными к формированию многослойных структур. При спонтанной и ускоренной дифференцировке, сопровождавшейся значительным ростом активности ЩФ, в клетках с Т+ выраженно возрастал уровень Т-кадгерина, преимущественно в мембранной фракции, что указывает на позитивную связь белка со степенью зрелости энтероцитов.

Таким образом, Т-кадгерин при гиперэкспрессии эффективно транслоцируется на плазматическую мембрану, сохраняя функциональность, и модулирует пространственную организацию клеток Caco-2, не препятствуя их энтероцитарной дифференцировке. Полученные данные расширяют представления о роли Т-кадгерина в эпителиальном морфогенезе и подчеркивают его потенциальную протективную роль при патологиях кишечника.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания 03р-23/110- 03.

КОНСТРУИРОВАНИЕ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК И ПОЛУЧЕНИЕ CRISPR-ОПОСРЕДОВАННЫХ НОКАУТОВ ПО ГЕНАМ БЕЛКОВ HSP90, HSP70 И HSP27 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Дарьюшкина Е.С.[1*], Шевнина В.В. [1], Михайлова Е.Р.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: daryushkina.yekaterina@bk.ru*

Белки теплового шока (HSP) обеспечивают фолдинг, стабильность и деградацию белков. В опухолевых клетках наблюдается их сверхпродукция, что способствует выживанию опухоли в условиях стресса, агрессивному течению заболевания и устойчивости к терапии.

Наибольшее значение в онкогенезе имеют Hsp90, Hsp70, Hsp27. Hsp90 стабилизирует ключевые онкобелки — HER2, EGFR, AKT, BCR-ABL, HIF-1α, патогенную изоформу p53, предотвращая их убиквитинирование и протеасомную деградацию. HSP70 и HSP27 ингибируют апоптоз: блокируют апоптосому, каспазы, JNK-путь и p53-зависимую гибель клеток. Также белки семейства HSP участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе, повышают инвазивность и метастатический потенциал, регулируя MMP, интегрины и TGF-β-сигналинг.

Однако роль белков семейства HSP в онкогенезе изучена не до конца. Отсутствие стабильных нокаутных клеточных линий остаётся серьёзным ограничением для изучения вклада отдельных изоформ HSP в инициацию, прогрессию и метастазирование опухолей.

Для решения этой проблемы нами было принято решение получить нокаутные клеточные линии по генам белков Hsp90, Hsp70 и Hsp27 с использованием технологии CRISPR CAS9. К каждому гену были сконструированы направляющие РНК с использованием онлайн-инструмента https://design.synthego.com/#/. Выбор последовательностей осуществляли на основе следующих

критериев: наличие PAM-мотива «NGG» на 3'-конце целевой последовательности, минимальный GC-состав для предотвращения образования вторичных структур, снижающих эффективность транскрипции под контролем промотора U6, минимизация off-target эффектов. После полученные направляющие РНК были клонированы в плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) по сайту рестриктазы *Bbs*I. Данные векторы будут использованы для получения нокаутных по генам белков семейства HSP опухолевых клеточных линий.

На данный момент плазмида на нокаут гена *HSP1A1*(Hsp70) была успешно трансфецирована в HEK293T при помощи полиэтиленимина. Вставка была подтверждена флуоресцентной микроскопией и проточной цитометрией. Эффективность доставки плазмиды, подтверждённая GFP-флуоресценцией, составила до 15,50%. Проведена FACS-сортировка GFP-положительных клеток, в результате которой отобрано 81 007 клеток (10,52% от общего количества), пригодных для дальнейшего культивирования. Ведутся работы по получению плазмид на нокаут по другим генам белков семейства HSP, а также трансфекция плазмидой опухолевых клеток.

НОВЫЙ ДНК-АПТАМЕР GOL1 КАК ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ EGFRvIII В ПРОЛИФЕРАЦИИ И МИГРАЦИИ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Дзариева Ф.М.[1,2*], Павлова Г.В.[1,2]

1. *ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН», Москва, Россия*
2. *ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава РФ, Москва, Россия*

E-mail: dz.fatima@mail.ru*

Глиобластома – наиболее агрессивная первичная опухоль головного мозга с крайне низкой выживаемостью пациентов. В половине

случаев ключевым драйвером является мутантная форма рецептора эпидермального фактора роста EGFRvIII, которая отсутствует в здоровых тканях и конститутивно активирует пролиферацию и миграцию. Однако существующие ингибиторы неселективны и плохо проникают через гематоэнцефалический барьер. Цель работы – с помощью нового ДНК-аптамера Gol1, селективного к EGFRvIII, изучить физиологическую роль этого рецептора в регуляции роста и подвижности опухолевых клеток.

Аптамер Gol1 получен методом компьютерного дизайна и молекулярно-динамического моделирования на основе исходной последовательности U2. Созданы трансгенные клеточные модели с гиперэкспрессией EGFR дикого типа и EGFRvIII. Пролиферацию измеряли MTS-тестом и системой xCELLigence, миграцию – transwell-анализом, транскриптомные изменения – методом RNA-seq. Накопление аптамера in vivo исследовали на ортотопической модели глиобластомы у крыс с помощью флуоресцентной и ПЭТ-КТ визуализации.

Было показано, что аптамер Gol1 высокоселективно связывается с EGFRvIII. На первичных культурах глиобластомы, позитивных по EGFRvIII, обработка аптамером приводила к подавлению пролиферации и миграции опухолевых клеток, при этом аптамер не был токсичен для нормальных клеток. Транскриптомный анализ выявил переключение клеточной программы с пролиферативной на нейрогенную дифференцировку. В трансгенных клетках с EGFRvIII Gol1 подавлял ключевые гены выживаемости. Проникновение аптамера в клетки осуществляется через клатрин-зависимый эндоцитоз. При системном введении животным Gol1 накапливался в опухолевой ткани, включая инвазивные клетки на границе со здоровым мозгом. ПЭТ-КТ с меченым аптамером подтвердила селективное накопление в опухоли при отсутствии сигнала в нормальной ткани.

Разработанный аптамер Gol1 является первым высокоселективным инструментом для изучения физиологической роли EGFRvIII. Блокирование этого рецептора подавляет пролиферацию и

миграцию глиобластомы за счёт индукции нейрогенной дифференцировки и отключения сигнального пути выживаемости. Способность Gol1 преодолевать гематоэнцефалический барьер и специфически накапливаться в опухоли открывает перспективы его использования для таргетной диагностики и терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2024-561).

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ИРИДИЯ(III) С АЦИКЛИЧЕСКИМИ ДИАМИНОКАРБЕНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ В КЛЕТКАХ HCT116

Зуева А.К.[1, 2], Гнедина О.О.[1, 2], Кинжалов М.А.[2], Иготти М.В[1, 2*]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: marie.igotti@incras.ru*

Комплексы металлов платиновой группы с ациклическими диаминокарбеновыми (ADC) лигандами перспективны в медицинской химии благодаря высокой стабильности связи металл–углерод и способности N–H групп образовывать направленные водородные связи с биомишенями. Однако цитотоксический потенциал и механизмы действия комплексов иридия этого класса практически не изучены. Настоящая работа посвящена исследованию антипролиферативной активности и сигнальных путей гибели клеток, индуцируемых новыми ADC-комплексами иридия(III) 13 и 14 на модели колоректальной карциномы HCT116. Антипролиферативное действие соединений оценивали с помощью

МТТ-теста, окрашивания кристаллическим фиолетовым и колониеобразующего анализа. Индукцию апоптоза и аутофагии анализировали методом вестерн-блоттинга по содержанию PARP, каспазы-3, p62 и LC3, а также с помощью флуоресцентного окрашивания красителями MitoTracker и LysoTracker. Активность регуляторных киназ p38, JNK и Akt исследовали методом вестерн-блоттинга.

Установлено, что комплексы 13 и 14 дозозависимо подавляют пролиферацию и колониеобразование клеток HCT116 ($IC_{50} \approx 3$ мкМ). При этом не происходит расщепления каспазы-3 и PARP, а также изменения флуоресценции MitoTracker, что свидетельствует об отсутствии классического каспаз-зависимого апоптоза. Анализ маркеров аутофагии не выявил значимых изменений содержания p62 и липидированной формы LC3. Неизменная интенсивность сигнала LysoTracker подтвердила отсутствие активации аутофагического потока под действием исследуемых веществ. Напротив, вестерн-блоттинг показал значительное усиление фосфорилирования митоген-активируемых протеинкиназ p38 и JNK при одновременном подавлении фосфорилирования Akt. Сочетание активации стресс-киназ JNK/p38 и ингибирования антиапоптотического пути Akt формирует характерный молекулярный профиль параптоза — формы программируемой клеточной гибели, связанной с дисфункцией эндоплазматического ретикулума.

Таким образом, цитотоксическое действие новых ADC-комплексов иридия(III) в клетках HCT116 обусловлено индукцией параптоза, опосредованной одновременной активацией стресс-киназ p38/JNK и супрессией Akt, а не апоптозом или аутофагической гибелью. Полученные результаты обосновывают перспективность развития данного класса соединений в качестве индукторов альтернативных путей гибели опухолевых клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ и Санкт-Петербургского научного фонда (проект № 25-13-20028).

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ КЛЕТОК ЛЕЙКОЗА ДЛЯ АНАЛИЗА ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОЛЕЙКОЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Иваненко К.А.[1*], Лебедев Т.Д.[1], Прасолов В.С. [1]

1. ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН», Москва, Россия

E-mail: karina.ivanenko@mail.ru*

Количественный анализ морфологии клеток и клеточных процессов с помощью флуоресцентных красителей всё шире используется в исследованиях злокачественных заболеваний. В частности, флуоресцентная микроскопия позволяет оценить влияние противоопухолевых препаратов на гибель клеток и изучить механизмы их действия, например, оценить состояние митохондрий, выявить наличие нарушений митоза, накопление свободного железа и индукцию окислительного или репликативного стресса. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – злокачественное заболевание кроветворной системы, которое обладает высокой гетерогенностью и плохо поддаётся лечению. Для терапии ОМЛ используют препараты различного действия, например, ингибиторы киназы FLT3, индукторы апоптоза, ингибиторы ДНК-метилтрансфераз, а также различные антиметаболиты. Тем не менее, к любой из этих групп препаратов с высокой частотой развивается резистентность. Анализ механизмов гибели и клеточных процессов позволит выявить потенциальные уязвимости лейкозов разных типов.

В данной работе мы сначала подобрали условия для окрашивания клеток лейкоза: мы протестировали панель из 15 прижизненных флуоресцентных красителей ядер клеток, митохондрий, липидных структур, лизосом, аутофагосом, а также различных индикаторов клеточной гибели, на клетках ОМЛ человека HL-60 после воздействия 7 ингибиторами с известными механизмами действия. Для этого клетки обрабатывали препаратами и производили окрашивания через 24, 72 и 144 часа после добавления ингибиторов. На основе подобранных условий мы провели окрашивание 12

клеточных линий лейкозов человека и с помощью машинного обучения создали алгоритм определения подтипа клеток лейкозов по морфологическим параметрам. Методика позволяет различать плохо дифференцированные клетки лейкоза, лейкозные клетки моноцитарной, эритроидной и лимфобластной природы.

Разработанная методика позволила провести систематическое сравнение действия 27 препаратов на клетки HL-60 и MV4;11 по их способности индуцировать апоптоз, некроз, блокировать митоз и клеточный цикл. По результатам анализа изменения клеточных процессов в выживших клетках были предсказаны и проверены потенциальные комбинации противолейкозных препаратов.

Была разработана методика прижизненного окрашивания клеток лейкоза для определения подтипов клеток, измерения разных типов гибели клеток, а также поиска новых эффективных комбинаций противолейкозных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-24-01052).

ВИРУС СИНДБИС КАК КАНДИДАТНЫЙ АГЕНТ ДЛЯ ОНКОЛИТИЧЕСКОЙ ВИРОТЕРАПИИ

Капранов В.А.[1]*, Трачук К.Н.[1], Бирюкова Ю.К.[1], Колясникова Н.М.[1]

1. *ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия*

E-mail: kapranov_va@chumakovs.su*

Цель: Оценка перспективности вируса Синдбис для онколитической виротерапии опухолей поджелудочной железы.

Актуальность: Онколитическая виротерапия является перспективным направлением противоопухолевого лечения, что подтверждается клиническим применением вирусных препаратов

(например, T-VEC (Zhang et al., 2023)). В случае опухолей поджелудочной железы их гетерогенность и вариабельность противоопухолевого ответа обуславливают необходимость поиска и разработки новых вирусных платформ. Вирус Синдбис представляет интерес как потенциальный онколитик: в доклинических исследованиях показаны его безопасность и противоопухолевая активность (Takenouchi et al., 2015).

Материалы и методы: клеточные линии аденокарциномы поджелудочной железы человека PANC-1 и AsPC-1. Вирус: вирус Синдбис, изолят K1487 из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП имени М.П. Чумакова РАН». Цитопатический эффект оценивали микроскопически по состоянию монослоя клеток (Olympus CKX53); титрование проводили методом бляшек и qPCR. В связи с выявлением онколитического действия вируса было принято решение о начале работ по его генетической модификации, в рамках которых был разработан и утвержден теоретический дизайн рекомбинантного вируса, согласно которому планируется осуществить данную модификацию.

Результаты: Вирус Синдбис эффективно реплицируется в клетках аденокарциномы поджелудочной железы человека (PANC-1, AsPC-1) и оказывает выраженный онколитический эффект, что подтверждается инфекционным титром 10^7 БОЕ/мл (5×10^6 копий/мл) и разрушением монослоя к 4-м суткам. Осуществлен теоретический дизайн рекомбинантного вируса Синдбис, обеспечивающего экспрессию терапевтического гена при сохранении механизмов репликации и субгеномной экспрессии.

Выводы: Результаты свидетельствуют о наличии у вируса Синдбис выраженной онколитической активности и подтверждают целесообразность дальнейших исследований в направлении создания рекомбинантного онколитика на его основе.

Исследование выполнено в рамках ГЗ ФГАНУ «ФНЦИРИП имени М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), тема № FNZG-2024-0003.

МОДИФИЦИРОВАНИЕ КОМБИНАЦИИ GQICOMBI ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЕЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА

Колесникова В.А.,[1,2*], Павлова Г.В.[1,2]

1. *ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН», Москва, Россия*
2. *ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии имени ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия*

E-mail: v.kolesnikova@ihna.ru*

Глиомы представляют собой гетерогенную группу опухолей центральной нервной системы различной степени злокачественности. Одним из факторов их устойчивости к терапии является наличие опухолевых глиомных стволовых клеток, обладающих выраженной резистентностью к стандартным методам лечения. Перспективным направлением преодоления такой резистентности является дифференцировочная терапия с использованием комбинации GQIcombi, включающей последовательное воздействие цитостатического аптамера bi-(AID-1-T) и нейроиндукторных факторов SB431542, LDN-193189, purmorphamine и BDNF. Однако практическое применение данной стратегии ограничено, в том числе из-за недостаточной способности ее компонентов преодолевать гематоэнцефалический барьер, что делает актуальным поиск способов доставки для повышения эффективности комбинации в зоне роста опухоли или модификации самой комбинации.

В работе исследовали возможность модификации GQIcombi за счет добавления нового аптамера с антипролиферативными свойствами, а также варьировали комбинации и режимы добавления малых молекул. В качестве модели использовали клеточные культуры глиобластом человека grade 4, полученные после резекции опухолей в НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко: G01, Sus\fP2 и 40. Пролиферативную активность клеток после воздействия оценивали с помощью MTS-теста и системы

XCelligence RTCA S16 в режиме реального времени. Анализ проводили на 10-е сутки эксперимента.

Были протестированы варианты включения в исходную схему антипролиферативного аптамера bi-(AID-1-C), а также режимы повторного введения нейроиндукторных молекул с увеличением их концентрации. Во всех исследованных клеточных культурах наиболее выраженный эффект, приводящий к гибели клеток, был зарегистрирован при использовании комбинации GQIcombi+bi-(AID-1-C).

Таким образом, показано, что модифицированная комбинация GQIcombi с добавлением bi-(AID-1-C) обладает повышенной эффективностью в отношении клеток глиобластомы человека и может рассматриваться как перспективный вариант для дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075–15-2024–561).

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ WIP1 И RAC1 В СОЧЕТАНИИ С ПРЕПАРАТАМИ ПЛАТИНЫ НА ЭКСПРЕССИЮ МАЛЫХ ГТФАЗ, ZEB1 И ПОДВИЖНОСТЬ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Коноплёва С.А.[1*], Михайловская В.С.[1], Демидов О.Н.[1,2], Бобков Д.Е.[1,2]

1. *АНОО ВО Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия*
2. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: s.konopleva.s@mail.ru*

Цель. Оценить влияние ингибиторов Wip1 (GSK2830371) и Rac1 (NSC23766) в сочетании с препаратами платины на экспрессию

генов малых ГТФаз, Zeb1 и метрики клеточной подвижности в модели колоректального рака.

Актуальность. Малые ГТФазы семейства Rho и Zeb1 участвуют в регуляции клеточной пластичности, миграции и лекарственной устойчивости при колоректальном раке. Влияние их таргетного ингибирования на миграционный фенотип опухолевых клеток изучено недостаточно.

Методы. Исследование выполнено на клетках мышиной линии MC-38. Экспрессию генов Rac1, Cdc42, RhoA и Zeb1 анализировали методом RT-qPCR. RT-qPCR была выполнена в 4 биологических повторностях. Подвижность клеток оценивали методом single-cell tracking при прижизненной микроскопии в системе CelenaX с последующим анализом в Fiji и TrackMate.

Результаты. Цисплатин индуцировал повышение экспрессии Rac1, Cdc42, RhoA и Zeb1. NSC23766 вызывал компенсаторную индукцию экспрессии Rac1, максимальную в комбинации с цисплатином (Rac1 FC 22,72), что соответствовало наибольшей средней скорости миграции клеток (15,21 ± 7,36 мкм/ч против 13,53 ± 5,08 в контроле). Комбинация GSK + цисплатин сопровождалась увеличением прямолинейности движения (LFP 0,453 против 0,244 в контроле). Тройная комбинация GSK + NSC + цисплатин снижала как транскрипционный ответ, так и среднюю скорость миграции по сравнению с двойными комбинациями.

Выводы. Комбинации ингибиторов Wip1 and Rac1 с препаратами платины оказывают разнонаправленное влияние на молекулярные и фенотипические параметры клеток MC-38. Полученные данные подтверждают необходимость параллельной оценки экспрессии генов и параметров клеточной подвижности при разработке комбинированных подходов к терапии колоректального рака.

Исследование поддержано государственной программой «Научно-технологическое развитие федеральной территории "Сириус"» (соглашение № 3-03 от 18.02.2025).

АКТИВАЦИЯ STING-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ АКРИДОНУКСУСНОЙ КИСЛОТОЙ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ИНДУКЦИЕЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО И АПОПТОТИЧЕСКОГО ОТВЕТА В КЛЕТКАХ МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА ЧЕЛОВЕКА

Кораблева П.Е.[1*], Невзоров И.А. [1], Барлев Н.А. [1,2], Дакс А.А[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan*

E-mail: korablevapolina936@gmail.com*

Сигнальный каскад STING активируется в ответ на увеличение концентрации ДНК в цитоплазме клетки. Помимо индукции экспрессии интерферонов I типа, активация STING-пути имеет проапоптотический эффект, и ряд препаратов, активирующих данный каскад, сейчас находится на разных стадиях клинических испытаний.

Акридонуксусная кислота (10-carboxymethyl-9-acridone, CMA) является эффективным агонистом белка STING в клетках домовой мыши и вызывает интерфероновый ответ I типа через активацию транскрипционного фактора IRF3 в макрофагах. На Т-клетках мышей также была показана способность CMA индуцировать апоптоз по митохондриальному пути. Целью данной работы являлось изучение влияния CMA на опухолевые клетки человека.

Исследование проводилось на клеточных линиях миелоидного лейкоза человека KG1 и K562. Клетки обрабатывались CMA в концентрации 1, 4 и 8 мМ на протяжении 3 и 16 ч. Для оценки уровня содержания белков использовался вестерн-блот анализ, для определения уровня экспрессии генов — полимеразная цепная реакция в реальном времени, жизнеспособность клеток оценивалась с помощью MTT-теста, а синергическое действие препаратов определялось с помощью ZIP-модели.

В обеих исследованных клеточных линиях под действием CMA наблюдалось увеличение содержания фосфорилированных форм

STING и IRF3, что свидетельствует об активации сигнального пути STING. Обработка клеток СМА сопровождалась повышением экспрессии генов *IFNB1*, *IL1B* и *IL6* в 2–4 раза. Кроме того, СМА оказывала проапоптотическое действие, увеличивая экспрессию генов-регуляторов апоптоза (*BAK*, *BBC3*, *BCL2*, *NOXA*) в 3–4 раза в клеточной линии KG1 и в 6-10 раз в клеточной линии K562. Анализ цитотоксичности показал, что СМА индуцирует гибель клеток обеих линий, при этом значения IC_{50} составили 12 мМ для KG1 и 8 мМ для K562. На обеих клеточных линиях был продемонстрирован значительный антагонистический эффект совместного применения СМА с доксорубицином и с цисплатином и ярко выраженный синергический эффект при применении СМА в сочетании с венетоклаксом.

В результате данного исследования было продемонстрировано, что СМА вызывает активацию сигнального каскада cGAS-STING и индуцирует STING-зависимые провоспалительный и апоптотический ответы. Сочетание СМА как доксорубицином, так и с цисплатином снижает цитотоксичность данных препаратов, в то время как совместное применение СМА и венетоклакса демонстрирует синергический эффект.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-45-04002).

ОЦЕНКА АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОДИГИОЗИНА В СОСТАВЕ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ НА КЛЕТКАХ MCF-7

Крантова В.Э.[1*], Гурьянов И.Д.[1], Сабирова С.В.[1], Науменко Е.А.[1]

1. *Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Институт Фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия*

E-mail: veronikakrantova@yandex.ru*

Внеклеточные везикулы признаны медиаторами межклеточной коммуникации и являются перспективными носителями для различных соединений. Выявленные противораковые свойства продигиозина (ПГ) обладают большим потенциалом в подавлении пролиферации раковых клеток. Использование ПГ, ассоциированного с мембранными везикулами (МВ), облегчает прохождение через липидную мембрану раковых клеток и способствует более равномерному распределению в клеточном окружении. Кроме того, МВ увеличивают шанс дальнейшего блокирования различных этапов онкогенеза. Целью данной работы является оценка влияния ПГ, инкапсулированного в МВ, на пролиферацию и жизнеспособность клеток рака молочной железы MCF-7.

В исследовании МВ получали из клеток HEK293 с использованием цитохалазина B (МВ-ЦВ) или ПГ (МВ-ПГ). Клетки инкубировали в бессывороточной среде DMEM, содержащей 10 мкг/мл цитохалазина B или 250 нг/мл ПГ, в течение 30 мин при 37 °C во влажной атмосфере. Затем была проведена серия последовательных центрифугирований суспензии/супернатанта клеток. Коллоидные свойства определяли с помощью анализа отслеживания наночастиц. Жизнеспособность клеток MCF-7 определяли методом MTT-анализа. Количество живых и мертвых клеток анализировали с помощью автоматического счетчика клеток. Для оценки

пролиферации клеток использовали флуоресцентный краситель CellTrace Violet.

Значения дзета-потенциала МВ, выделенных из клеток HEK293, варьируются от -13,75 мВ до -19,5 мВ. МТТ-анализ показал, что МВ-ПГ снижают жизнеспособность клеток MCF-7 до 66,7% по сравнению с контролем, в то время как свободный ПГ – до 53,9%. С помощью автоматического счетчика клеток, было выявлено, что свободный ПГ показал 100% гибель клеток MCF7, в то время как МВ-ПГ снижали количество клеток MCF-7 до 17,9% по сравнению с контролем. Эти результаты подтверждают данные проточной цитометрии. Относительная скорость пролиферации (ОСП) клеток MCF-7 под действием ПГ снизилась в 1,5 раза ($p=0,03$). Также наблюдалась тенденция к снижению ОСП клеток после воздействия МВ-ПГ в 1,4 раза, однако результаты не достигли статистической значимости.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что отрицательный дзета-потенциал микровезикул подтверждает их нативную липидную природу. ПГ в составе МВ демонстрирует выраженный антипролиферативный эффект на клетки MCF-7. Эти данные подтверждают перспективность использования МВ в качестве системы доставки ПГ с противоопухолевым действием.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030».

ОНКОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА В МОДЕЛЯХ РАКА ЛЕГКОГО

Макарова А.А.[1*], Саркисова В.А[1]

1. ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН», Москва, Россия

E-mail: anastasiam040503@gmail.com*

Вирус болезни Ньюкасла (ВБН) — перспективный представитель онколитических вирусов, способный селективно лизировать раковые клетки и стимулировать противоопухолевый иммунитет. Однако, тропизм и молекулярные эффекты разных штаммов ВБН существенно отличаются, что затрудняет как сравнительный анализ, так и экстраполяцию имеющихся данных на новые штаммы с неизвестным онколитическим потенциалом. Таким образом, целью данной работы являлось исследование онколитической активности малоизученного вакцинного штамма Н (ВБН-Н) в контексте терапии рака легкого. Была произведена оценка пермиссивности клеточных линий рака легкого человека к ВБН-Н с помощью иммуноцитохимического окрашивания и анализа кинетики репликации. Дополнительно осуществляли анализ жизнеспособности клеток после инфекции методом резазуринового теста. Все исследованные клеточные линии рака легкого человека (A549, NCI-H-226, H1299) оказались пермиссивны к ВБН-Н, при этом цитопатический эффект был наиболее выражен спустя 48 часов после инфекции.

Другой ключевой задачей данной работы являлся подбор сингенной мышиной модели для оценки терапевтической активности ВБН-Н in vivo. Была произведена оценка пермиссивности мышиных опухолевых клеточных линий к ВБН-Н: B16, EMT6, 4T1, CT26, LL/2, EAC. Несмотря на то, что большинство проанализированных линий были низкочувствительны к ВБН, выраженный цитопатический эффект отмечался для LL/2 и EAC. На основании данных проточной цитометрии по оценке жизнеспособности, а также кинетики репликации, в качестве подходящей модельной

линии была выбрана карцинома легкого Льюиса (LL/2). Для оценки терапевтической активности *in vivo* осуществляли внутривенное введение ВБН-Н самкам мышей линии C57BL/6 с подкожными опухолями LL/2. При однократном еженедельном введении было отмечено статистически значимое торможение роста опухоли по сравнению с контрольной группой. Различия в среднем объеме опухоли между двумя группами выявлялись начиная с 21-го дня после начала лечения. Таким образом, нами впервые продемонстрирована онколитическая активность штамма ВБН-Н в клеточных линиях рака легкого человека, а также в сингенной мышиной модели рака легкого, что обосновывает дальнейшее изучение этого штамма в качестве потенциального терапевтического агента.

Работа выполнена при финансовой поддержке министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2030 годы, проект № 075-15-2025-519).

ЗА РАМКАМИ КЛАССИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ: ПРОФИЛЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Максимова В.П.[1*], Попова В.Г.[1], Лылова Е.С.[1], Власова О.А.[1], Антошина Е.Е.[1], Горькова Т.Г.[1], Труханова Л.С.[1], Кудряшов А.С.[1,2], Евстюшина В.С.[1,3], Якубовская М.Г.[1,2], Кирсанов К.И.[1,3]

1. *ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия*
2. *ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия*
3. *ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия*

E-mail: lavarvar@gmail.com*

Эпигенетическая регуляция транскрипции играет ключевую роль в поддержании клеточной пластичности и адаптации. Нарушение эпигенетических механизмов является одним из факторов онкогенеза и возникновения резистентности к терапии. Динамичный и обратимый характер эпигенетических изменений определяет возможность их фармакологической коррекции. В связи с этим одним из направлений совершенствования противоопухолевой терапии является поиск эпигенетических модуляторов среди соединений с известной противоопухолевой активностью и изучение эпигенетических механизмов действия применяемых препаратов. Целью исследования был поиск эпигенетически активных соединений среди противоопухолевых препаратов из различных классов с последующей характеристикой молекулярных механизмов выявленных эффектов.

Интегральную эпигенетическую активность агента оценивали по уровню реактивации эпигенетически репрессированного гена *GFP* в клетках HeLa TI с помощью проточной цитометрии. Глобальное метилирование ДНК анализировали с помощью метил-чувствительной ИФА, уровень гистоновых модификаций и

хроматин-модифицирующих ферментов — методом вестерн-блоттинга.

Среди генотоксичных агентов выраженный интегральный эпигенетический эффект был показан для цисплатина, оксалиплатина, цитарабина, 5-фторурацила, гемцитабина, пеметрекседа, топотекана, доцетаксела, винкристина и эрибулина. Среди таргетных соединений эпигенетическую активность проявили ингибиторы mTOR (AZD8055), PI3K (вортманнин), протеасом (бортезомиб), EGFR (цетуксимаб), FACT (CBL0137), PKC (энзастаурин) и дексаметазон.

Для антиметаболитов выявлено повышение уровня HDAC1, что может отражать компенсаторный ответ клеток на изменение состояния хроматина и повреждение ДНК. Бортезомиб снижал уровень HDAC1 и глобальное метилирование ДНК, а дексаметазон — HDAC1. Для энзастаурина был показан направленный мультитаргетный эффект: снижение уровня HDAC1/3, SIRT1 и DNMT1/3a при повышении ацетилирования гистонов и гипометилировании ДНК. Дополнительно снижалась экспрессия DOT1L и BRD2/4, ассоциированных с прогрессией онкогенеза. CBL0137 также оказывал комплексное эпигенетическое действие, вызывая снижение уровня BRD2/3/4 и DNMT1/3a, наряду с глобальным гипометилированием ДНК.

Таким образом, для ряда соединений показаны специфические изменения эпигенетических регуляторов, тогда как энзастаурин и CBL0137 вызывали комплексную перестройку нескольких механизмов регуляции хроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-15-00432).

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ТЕРПЕНОИДОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ДОРМАНТНЫХ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА HCT116

Мачнева Я.Г.[1*], Моршнева А.В.[1], Иготти М.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: machneva-y@yandex.ru*

В настоящее время колоректальный рак является одной из самых агрессивных форм онкологических заболеваний за счет высокого риска развития рецидива. Так, часть опухолевых клеток способна входить в дормантное состояние, связанное с временным митотическим блоком, что позволяет им пережить химиотерапию и сформировать минимальную остаточную болезнь.

Перспективным подходом к элиминированию таких выживших клеток является использование природных фитохимических соединений, оказывающих плейотропный эффект с воздействием на множество сигнальных путей, что позволяет рассматривать их как привлекательную мишень для борьбы с клетками остаточной популяции.

Целью исследования было определение фитохимических соединений, наиболее эффективно элиминирующих дормантные клетки аденокарциномы толстой кишки HCT116, выжившие после обработки оксалиплатином.

В работе использовалась модель опухолевого рецидива in vitro на основе клеток HCT116, устойчивых к оксалиплатину (HCT116-OX)(Morshneva et al. 2025). Дормантное состояние индуцировали 6-часовой обработкой высокой дозой оксалиплатина (150 мкМ). В ходе первичного скрининга 15 фенольных соединений и терпеноидов при 48-часовом действии на клетки HCT116-OX были определены значения IC50. Далее исследуемые агенты вносили на 3-й и 6-й дни после индукции дормантности, а жизнеспособность клеток

остаточной популяции оценивали на 12-й день с помощью МТТ-теста.

По результатам этих тестов было выявлено 7 перспективных кандидатов из класса фенольных соединений и терпеноидов, наиболее выраженно снижающих жизнеспособность дормантных клеток колоректального рака: кукурбитацин Б, плюмбагин, госсипол, бетулиновая кислота, кемпферол, ресвератрол и кверцетин.

Полученные данные обосновывают целесообразность последующего изучения данных соединений в контексте борьбы с клетками остаточной популяции и предотвращения опухолевого рецидива, а также их потенциального применения в качестве самостоятельных агентов или в комбинированной терапии онкологических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №25-75-00172).

РЕАКТИВАЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА С ПОМОЩЬЮ АДЕНОВИРУСНОГО БЕЛКА E1A КАК СПОСОБ ПРЕОДОЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА К ОКСАЛИПЛАТИНУ

Медведева А.А.[1*], Моршнева А.В.[1], Иготти М.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: aksiniya.a.medvedeva@mail.ru*

ДНК-повреждающие препараты, в том числе препараты платины, нацелены на активно реплицирующиеся клетки. Замедление или остановка клеточного цикла могут быть защитным механизмом, обеспечивающим выживание клеток при химиотерапии. В связи с этим активация клеточного цикла может рассматриваться как потенциальный инструмент сенсибилизации клеток к воздействию. В качестве агента, активирующего клеточный цикл, используется аденовирусный белок E1A.

Исследование проводили на чувствительных и устойчивых к оксалиплатину клетках аденокарциномы толской кишки человека HCT116 (HCT116 и HCT116-OX). Экспрессию E1A индуцировали с помощью доксициклин-зависимой системы. Клетки обрабатывали оксалиплатином в течение 12-48 часов. Оценку клеточного цикла проводили методом проточной цитометрии, синтез ДНК оценивали по включению EdU. Уровень связанных с репликацией повреждений ДНК оценивали по накоплению фосфорилированного гистона pH2AX, который является маркером двуцепочечных разрывов ДНК и репликативного стресса.

Из полученных результатов следует, что оксалиплатин вызывает значительное снижение доли устойчивых клеток в S-фазе уже через 12 часов, тогда как чувствительные клетки через 12 часов после воздействия оксалиплатина продолжают активно пролиферировать. К 48 часам доля клеток в S-фазе в устойчивой линии снижалась с 30% до 5% (против снижения с 42% до 20% у HCT116), что является возможным механизмом избегания повреждений ДНК, вызываемых оксалиплатином. Однако индукция экспрессии E1A на фоне обработки оксалиплатином приводила к активации клеточного цикла в резистентных клетках: доля S-фазы возрастала с 5,8% до 14%, что подтверждалось восстановлением включения EdU и свидетельствовало о возобновлении синтеза ДНК. При этом реактивация цикла сопровождалась усилением гибели популяции устойчивых клеток и накоплением pH2AX, указывающим на индукцию репликативного стресса.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что белок E1A усиливает чувствительность клеток к оксалиплатину за счет реактивации клеточного цикла, приводящей к развитию репликативного стресса в клетках с поврежденной ДНК. Полученные результаты демонстрируют потенциальную перспективность комбинации ДНК-повреждающих препаратов с активаторами клеточного цикла для терапии резистентного колоректального рака.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-25-20164) и гранта Санкт-Петербургского научного фонда.

МОДЕЛИРОВАНИЕ И ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КСЕНОГРАФТОВ STK11/LKB1-МУТАНТНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ДЛЯ ОЦЕНКИ КОМБИНИРОВАННОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Михайловская В.А.[1*], Ганцова Е.А[2,3], Гордон К.Б. [1]

1. *Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия*
2. *НИИ молекулярной и клеточной медицины ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия*
3. *Национальный исследовательский центр хирургии имени академика П.Г. Петровского, Москва, Россия*

E-mail: rybachuk2016@list.ru*

Аденокарцинома легкого (LUAD) – частый подтип немелкоклеточного рака. Мутации STK11/LKB1 связаны с агрессивным течением, метастазированием и резистентностью к терапии. Экспериментальное моделирование необходимо для изучения патогенеза и новых подходов к терапии. В ходе предыдущих исследований участниками нашей группы были получены клеточные линии LUAD с нокаутом STK11/LKB1 (A549-KO, LLC1-KO) с измененной чувствительностью к адронной терапии *in vitro*. Для перехода к *in vivo* созданы опухолевые модели, гистологический анализ которых важен для оценки комбинированной терапии с ингибированием PCSK9. Цель – гистологическая характеристика моделей STK11/LKB1-мутантной LUAD на линиях A549 и LLC1.

В работе использовали мышей-самцов двух линий: Balb/c Nude и C57Bl/6. Опухолевые узлы, полученные от мышей после подкожной инокуляции клеточных суспензий: LLC1-STK11-KO (3,5 млн) самцам C57Bl/6 и A549-STK11-KO (4 млн) самцам Balb/c Nude. Ткань опухолей замораживали в среде Tissue-TEK, делали криосрезы (5 мкм), фиксировали метанолом, окрашивали гематоксилином-эозином. Иммуногистохимическое исследование проводили с антителами к Ki67 и CD68, визуализация с FITC и DAPI. Подсчитывали общее число DAPI+ ядер и число CD68+ клеток, вычисляли индекс CD68 как отношение числа CD68+ клеток к общему числу клеток.

На криосрезах подкожных опухолей была выявлена морфология агрессивной аденокарциномы. Узлы имели плотную капсулу с очагами фиброза и выраженную внутриопухолевую десмоплазию в виде коллагеновой сети, формирующей жесткий стромальный каркас, что создавало барьер для доставки терапевтических агентов и способствовало прогрессии. Сосуды были структурно аномальны, с нарушенной перфузией и гипоксическими зонами, которые ассоциировались с обширными некрозами в центре из-за дисбаланса пролиферации и кровоснабжения. Паренхима отличалась клеточным атипизмом: преобладали гиперхромные полиморфные ядра, встречались веретеновидные формы, указывавшие на мезенхимальную дифференцировку и инвазивность. Гистоархитектоника была утрачена, клетки располагались хаотично. В микроокружении наблюдались очаги лимфогистиоцитарной инфильтрации как признак противоопухолевого иммунного ответа. Иммуногистохимическое исследование подтвердило высокую пролиферацию (Ki67+) и позволило оценить макрофагальную инфильтрацию (CD68+) в образцах.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-45-00031).

АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА УСТОЙЧИВЫХ К ПРЕПАРАТАМ ПЛАТИНЫ СУБЛИНИЙ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА HCT116 ПРИ ДЕЙСТВИИ ОКСАЛИПЛАТИНА

Моршнева А.В.[1*], Медведева А.А.[1], Иготти М.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: amorshneva@incras.ru*

Способность опухолевых клеток перестраивать регуляцию клеточного цикла в ответ на генотоксический стресс может рассматриваться как один из механизмов формирования лекарственной устойчивости, снижающей эффективность противоопухолевой терапии и приводящей к развитию рецидива.

В данной работе с помощью анализа клеточного цикла методом проточной цитометрии и репликативной активности клеток методом встраивания EdU (5-этинил-2'-дезоксиуридина) был проведен скрининг ряда сублиний клеток аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 с независимо сформированной устойчивостью к препаратам платины (HCT116-CS и несколько сублиний HCT116-OX с устойчивостью к цисплатину и оксалиплатину, соответственно) для оценки разнообразия вариантов регуляции клеточного цикла при воздействии 25 мкМ оксалиплатина. По результатам скрининга сублиний с устойчивостью к препаратам платины была выявлена значительная гетерогенность механизмов регуляции клеточного цикла при действии оксалиплатина. Так, 24-часовое воздействие оксалиплатина приводит к накоплению чувствительных клеток HCT116 в S-фазе клеточного цикла, что говорит о задержке прохождения фазы синтеза ДНК при повреждении ДНК. Большинство резистентных сублиний продемонстрировали схожее накопление клеток в S-фазе, однако с большим по сравнению с устойчивыми клетками снижением сигнала EdU, что свидетельствует об остановке репликации. При этом в отдельных цисплатин- и оксалиплатин-устойчивых сублиниях

выраженное снижение сигнала EdU сопровождалось также снижением доли клеток в S-фазе в 7–22 раза относительно контрольных пролиферирующих клеток.

Таким образом, быстрая остановка клеточного цикла в ответ на ДНК-повреждающий агент может способствовать выживанию клеток и выступать как один из механизмов лекарственной устойчивости.

Полученные результаты подтверждают предположение о многообразии возможных механизмов резистентности даже в пределах одной клеточной линии, что потенциально может быть использовано при поиске новых подходов противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-75-00172).

РЕГУЛЯЦИЯ STING-ЗАВИСИМОГО ЦИТОКИНОВОГО ОТВЕТА МЕТИЛТРАНСФЕРАЗОЙ SETD7 В КЛЕТКАХ РАКА ЛЁГКОГО

Невзоров И.А.[1*], Кораблёва П.Е.[1], Дакс А.А[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: nevzorovia10@gmail.com*

Сигнальный путь cGAS-STING является ключевым механизмом врождённого иммунитета, который обеспечивает распознавание цитозольных нуклеиновых кислот и активацию интерферонового ответа. Известно, что при альтернативной активации данного каскада происходит переключение его функции с провоспалительной на проапоптотическую, что приводит к повышению экспрессии генов, участвующих в запуске запрограммированной клеточной гибели. Данная работа посвящена

исследованию механизмов регуляции сигнального каскада STING в клетках аденокарциномы легкого (АЛ).

В результате проведенного анализа данных РНК секвенирования образцов пациентов с АЛ, в качестве одного из важных регуляторов STING-каскада была выявлена метилтрансфераза SETD7.

Белок SETD7 — лизин-специфическая метилтрансфераза. Она участвует в регуляции клеточного цикла, репарации ДНК и воспалительных реакций и играет дуалистичную роль в канцерогенезе. При АЛ снижение экспрессии SETD7 ассоциировано с усилением пролиферации, миграции и повышением метастатического потенциала опухолевых клеток.

Для исследования роли SETD7 в регуляции STING-зависимого иммунного ответа в клетках АЛ использовался протокол трансфекции клеток ДНК спермы лосося (sspDNA). Мы показали, что трансфекция sspDNA эффективно индуцирует фосфорилирование компонентов пути STING-TBK1-IRF3 и стимулирует экспрессию интерферонов и провоспалительных цитокинов в клеточных линиях АЛ.

С использованием клеток H1299 со стабильным нокдауном SETD7 мы продемонстрировали, что подавление метилтрансферазы приводит к повышению экспрессии интерферона *IFNA1* и цитокина *IL1B*, проапоптотических генов *BAK1*, *BBC3* (PUMA), а также антиапоптотического гена *BCL2* при трансфекции sspDNA. Мы также показали, что нокдаун SETD7 приводит к снижению эффективности лентивирусной трансдукции клеток АЛ.

Полученные результаты демонстрируют, что SETD7 является важным регулятором сигнального каскада STING в клетках АЛ и может координировать его переключение с провоспалительного эффекта на проапоптотический. Кроме того, было показано, что SETD7 модулирует восприимчивость раковых клеток к вирусной инфекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-15-00428).

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ G-КВАДРУПЛЕКСНЫХ АПТАМЕРОВ НА РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК ГЛИОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

Павлова С.А.[1,2*], Фаб Л.В.[1], Дзариева Ф.М.[1,2], Копылов А.М.[2,3], Павлова Г.В. [1,2].

1. *ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия*
2. *ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*
3. *Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail:pavlova.sweti@yandex.ru*

Глиомы - гетерогенная группа опухолей нейроэктодермального происхождения, на долю которых приходится около 30% всех первичных опухолей головного мозга. Глиомы высокой степени злокачественности (HGG) остаются одной из наиболее сложных проблем онкологии, медиана выживаемости пациентов не превышает 12–15 месяцев. Основной причиной неизбежного рецидива является высокая инвазивность опухолевых клеток, а также способность стандартной терапии, включая лучевую, стимулировать миграцию выживших клеток и отбирать устойчивые субпопуляции, в том числе опухолевые стволовые клетки. Перспективным направлением повышения эффективности лучевой терапии является её сочетание с таргетными молекулами - аптамерами, способными избирательно воздействовать на опухолевые клетки.

Цель работы - оценить эффективность комбинированного воздействия лучевой терапии (20 Гр) и специфичных к клеткам глиомы G-квадруплексных аптамеров bi-(AID-1-T) и bi-(AID-1-C) на

пролиферативную и миграционную активность клеточных культур HGG человека.

Показано, что реакция клеток глиомы на облучение зависит от типа опухоли: у первичных культур после облучения снижается пролиферация, но нарастает миграционная активность выживших клеток, тогда как у культур рецидивов увеличиваются оба показателя. Сочетание облучения с аптамером bi-(AID-1-T) усиливает антипролиферативный эффект и подавляет миграцию в культурах первичных глиом, однако выжившие клетки характеризуются повышенной экспрессией маркеров стволовости и злокачественности (CD133, L1CAM, Nestin, CD44, Casp3).

Дополнение лучевой терапии комбинацией двух аптамеров, bi-(AID-1-C) и bi-(AID-1-T) (схема CT), продемонстрировало наиболее выраженный эффект: сочетанное воздействие облучения и комбинации аптамеров эффективно подавляло и пролиферацию, и миграцию клеток как первичных, так и рецидивных глиом HGG человека, снижая при этом экспрессию маркеров злокачественности и стволовости (Nestin, PARP1, c-Myc, L1CAM, Caveolin-1).

Таким образом, дополнение лучевой терапии последовательным воздействием комбинации аптамеров bi-(AID-1-C) и bi-(AID-1-T) обеспечивает радиосенсибилизацию клеток глиомы человека HGG, повышая антипролиферативный и антимиграционный эффект облучения и открывая перспективу для разработки новых схем комбинированной терапии глиом высокой степени злокачественности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2024-561).

ВЛИЯНИЕ siРНК И shРНК – ОПОСРЕДОВАННОГО НОКДАУНА ГЕНА РЕЦЕПТОРА HER3 НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА К ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ И ТАРГЕТНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Полякова А.А.[1,2*], Андреева Е.Н.[1,3], Коваль О.А.[1,2]

1. *Институт химической биологии и фундаментальной медицины имени Д.Г. Кнорре СО РАН, Новосибирск, Россия*
2. *Институт теоретической и прикладной механики имени С.А. Христиановича СО РАН, Новосибирск, Россия*
3. *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия*

E-mail: a.polyakova1@alumni.nsu.ru*

Белок HER3 (ErbB3) принадлежит к семейству рецепторов эпидермального фактора роста (ErbB), активно регулирующих процессы роста и деления клеток. Несмотря на то, что HER3 обладает пониженной тирозинкиназной активностью, аномальная экспрессия рецептора отмечена при различных онкологических заболеваниях. Поскольку HER3 способен формировать гетеродимеры с другими факторами семейства ErbB, например, с EGFR, нокдаун HER3 может иметь значение при использовании таргетных препаратов.

Цель работы – исследование влияния нокдауна гена HER3 с использованием синтетических siРНК и генетически кодируемых shРНК на цитотоксическую активность таргетных агентов: ингибитора топоизомеразы I топотекана, ингибитора EGFR AG-1478 на моделях клеток гепатоцеллюлярной карциномы Hep-G2 и меланомы A375 человека.

Биоинформатический анализ мРНК гена *ERBB3* позволил выбрать последовательности для нацеливания siРНК и shРНК. На основе вектора pLKO.1 получен набор целевых плазмид, экспрессирующих анти-HER3 shРНК. Мы показали, что трансфекция клеток A375 siРНК приводила к снижению уровня поверхностного белка HER3

на 13% через 24 часа. Трансфекция клеток плазмидами, экспрессирующими анти-HER3 shРНК, приводит к снижению уровня поверхностного HER3 у клеток Hep-G2 до 25% через 24 часа. При сравнении активности топотекана в условиях подавления экспрессии HER3 в клетках Hep-G2 с помощью siРНК и shРНК было показано, что только трансфекция shРНК-экспрессирующей плазмидой усиливала его цитотоксическое действие. Обработка клеток уникальным источником холодной плазмы, разработанным в ИТПМ СО РАН, частично ингибировала интернализацию HER3. Усиления цитотоксической активности AG-1478 при экспрессии shРНК с вектора не отмечено. Таким образом, временная трансфекция синтетическими siРНК и shРНК-экспрессирующими векторами оказывает слабый эффект РНК-интерференции и не позволяет усилить эффективность противоопухолевых препаратов.
Трансдукция клеток лентивирусом, содержащим shРНК, позволила увеличить эффективность нокдауна *ERBB3* до 30%. Тем не менее, такое подавление мРНК *ERBB3* не вело к усилению цитотоксической активности топотекана при воздействии на клетки Hep-G2. Можно предположить, что подавление экспрессии HER3 оказывает слабое влияние на активность исследованных препаратов и требует дополнительного исследования компенсаторных механизмов при разработке терапевтических стратегий, направленных на HER3.

Работа выполнена при финансовой поддержке МИНОБР № 075-15-2025-648.

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ МИЕЛОИДНОГО КОМПОНЕНТА МИКРООКРУЖЕНИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ СЕНОЛИТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Пухальская Т.В.[1,3*], Архангельская Ю.Н[1,4], Кузьмик И.В[1,2], Богданова Д.А[3], Демидов О.Н.[1,3]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*
3. *АНОО ВО Научно технологический университет «Сириус», Сириус, Россия.*
4. *ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет имени А. И. Герцена», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: tomapukhalskaya@gmail.com*

Колоректальный рак (КРР) является глобальной проблемой развитых стран и занимает второе место по смертности среди онкологических заболеваний. КРР в большинстве случаев возникает в результате накопления мутаций в генах *APC*, *RAS*, *TP53* и хромосомной нестабильности по классическому пути «аденома–карцинома». Около 10–20% диагностированных случаев развиваются по пути зубчатой неоплазии, который ассоциирован с мутациями в *RAS* и *RAF*. Отдельную, относительно небольшую группу составляет колит-ассоциированный КРР (colitis-associated cancer, CAC), возникающий на фоне хронического воспалительного заболевания кишечника.

Хотя CAC составляет лишь 2% от всех выявленных случаев КРР, он часто характеризуется неблагоприятным прогнозом из-за агрессивного течения и трудностей в лечении. В отличие от спорадического КРР, CAC обусловлен устойчивым, неразрешённым воспалением, которое посредством активных форм кислорода и азота способствует мутагенезу и прогрессии опухоли.

В поддержании этого хронического воспалительного микроокружения ключевую роль играют макрофаги. При длительном воспалении часть макрофагов может приобретать

сенесцентный фенотип, характеризующийся устойчивым провоспалительным профилем. Секретируемые сенесцентными макрофагами цитокины, хемокины и факторы роста поддерживают локальное воспаление и могут стимулировать пролиферацию и выживание опухолевых клеток. Селективное воздействие на сенесцентные клетки микроокружения опухоли представляется перспективной стратегией для разрешения хронического воспаления при колоректальном раке.

В данной работе исследовано влияние комбинации сенолитиков дазатиниб и кверцетин (DQ) в модели ТНФ и ЛПС индуцированного воспаления в опухоль ассоциированных макрофагах (TAMs), полученных из предшественников костного мозга мышей или перитонеальной полости мышей C57/Bl6, которые впоследствии были ассоциированы с колоректальным раком (MC38).

Было продемонстрировано снижение экспрессии маркера сенесцентных клеток — гена Cdkn*1a* в TAMs, увеличение маркера противовоспалительных макрофагов — манозного рецептора 1 типа, а также снижение экспрессии главного комплекса гистосовместимости 2 типа. Несмотря на увеличение секреции Il-6 при обработке TAMs комбинацией DQ в in *vitro* модели, лечение мышей с перитонеально привитыми опухолями MC38 комбинацией DQ с 5-фторурацилом приводило к снижению экспрессии гена *Il-6* в тканях опухоли мышей.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 25-25-00882).

КОМБИНИРОВАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ВИРОТЕРАПИИ И ХИМИОТЕРАПИИ КАК ИННОВАЦИОННЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ РАКА ЯИЧНИКА

Романенкова С.А.[1,2*], Неймышева Д.О.[1], Сологова С.С.[2], Чумаков П.М.[1]

1. *Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*
2. *ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия*

E-mail: sophiaromanenkova@gmail.com*

Опухоли яичника являются одними из самых трудноизлечимых и летальных гинекологических новообразований. Стандартом терапии рака яичника является паклитаксел – цитостатический препарат из группы таксанов. Несмотря на эффективность препаратов данной группы, к таксанам часто развивается лекарственная устойчивость. Одним из потенциальных путей преодоления лекарственной устойчивости может стать комбинирование химиотерапевтических препаратов с иммунотерапевтическими агентами, в частности с онколитическими вирусами. Онколитические вирусы (ОВ) – это вирусы, способные индуцировать гибель опухолевых клеток, не влияя на жизнедеятельность нормальных клеток организма. Вирус-опосредованный онколиз осуществляется путем прямого лизиса раковых клеток, а также путем активации противоопухолевого иммунитета. На сегодняшний день ОВ являются перспективным методом борьбы с раковыми заболеваниями, а некоторые лекарственные препараты на основе онколитических вирусов для терапии злокачественных новообразований одобрены регулирующими органами в Японии, Китае и США.

Целью данной работы является изучение комбинированного действия ОВ и паклитаксела на панели модельных клеточных линий рака яичника: SKOV-3, ES-2, TOV-112D, OVCAR-8, A1847 и MES-OV. В качестве виротерапевтических агентов для данной работы

использовались два вакцинных штамма энтеровирусов человека: полиовирус 1 типа и вирус Коксаки Б5.

В результате исследования было показано, что жизнеспособность клеточных линий SKOV-3, OVCAR-8 и ES-2 была значительно ниже при применении полиовируса 1 типа и вируса Коксаки Б5 совместно с паклитакселом, чем при монотерапии. На клетках линий MES-OV и A1847 статистически достоверное снижение процента живых клеток наблюдалось только при применении комбинации паклитаксела и вируса Коксаки Б5. На жизнеспособность клеточной линии TOV112D комбинированная терапия не оказала значительного эффекта. В рамках данной работы также было установлено, что паклитаксел не оказывает влияния на репликационную активность исследованных вирусов во всех протестированных культурах рака яичника.

Полученные данные позволяют рассматривать комбинацию паклитаксела и онколитических энтеровирусов человека как инновационный подход к терапии опухолей яичника.

Работа выполнена при финансовой поддержке Центра точного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины в рамках Федеральной программы развития генетических технологий в 2019-2027 гг. (проект № 075-15-2019-1660).

РОЛЬ AMPK В ВЫЗВАННОМ МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СТРЕССОМ ДОРМАНТНОМ СОСТОЯНИИ КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Руднева Д.М.[1*], Гладова Я.А.[1], Маргулис Б.А.[1], Гужова И.В.[1], Алхасан Б.А. [1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: daryarudneva0203@gmail.com*

Онкологические заболевания остаются одной из самых главных причин смерти в мире. Высокая смертность больных с данным диагнозом обусловлена не только тяжестью лечения и агрессивным течением болезни, но и высоким риском метастазирования и рецидивов, основной причиной которых является способность опухолевых клеток переходить в дормантное состояние. Изучение механизмов дормантности, а также разработка способов управления процессом перехода клеток в состояние “покоя” является одной из перспективных стратегий борьбы с онкологическими заболеваниями.

Исследование проводилось на клетках линии A549 (немелкоклеточный рак легкого), введенных в состояние дормантности при помощи депривации сыворотки. Вхождение клеток в “спящее” состояние характеризовалось повышением уровня фосфорилированной киназы p38, отвечающей за остановку клеточного цикла, а также снижением уровня фосфорилированных ERK1/2- участников сигнального каскада, регулирующего пролиферацию. Также модель продемонстрировала повышенную экспрессию генов-маркеров остановки клеточного цикла p27, DEC2, NR2F1 и стволовости SOX, c-Myc и Nanong на уровне мРНК. На данной модели было обнаружено повышение экспрессии белков p-AMPK, ULK1, LC3, ассоциированных с аутофагией, что свидетельствует о вероятном участии аутофагии в поддержании процесса дормантности. Подавление аутофагии дорсоморфином (ингибитором AMPK) вызвало нарушение входа клеток в

дормантное состояние и привело к снижению их выживаемости в условиях депривации сыворотки. Напротив, стимуляция AMPK активатором AMPKa привела к повышению выживаемости клеток. Анализ типа клеточной смерти с помощью окрашивания Annexin V/PI показал, что подавление AMPK приводит к значительному снижению выживаемости клеток, причем большинство из них находились на ранней или поздней стадии апоптоза. Дорсоморфин также оказал влияние на экспрессию гена маркера остановки клеточного цикла на уровне мРНК p16, а также повышение CDK1, необходимой для перехода G2/M и прохождения митоза.

На разработанной нами модели дормантности клеток линии A549 мы показали значимость процесса аутофагии в поддержании выживаемости опухолевых клеток в условиях голодания. Поскольку модуляция основной киназы, запускающей процесс аутофагии, AMPK оказывает значимое влияние на состояние дормантности, манипуляция этим процессом может становиться перспективным подходом к разработке комбинированной терапии, направленной на устранение покоящихся клеток — основной причины повторного возникновения злокачественных опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-74-00135).

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ АКТИВАТОРОВ АМФК ПРИ ЛЕЙКОЗЕ

Сагайдак А.В.[1,2*], Новикова Д.С.[1]

1. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: aleksandrasagaidak@yandex.ru*

АМФ-активируемая протеинкиназа (АМФК) является центральным регулятором клеточного метаболизма, обеспечивая поддержание энергетического баланса в клетках. Нарушение функционирования АМФК тесно связано с развитием метаболических, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, среди которых особое место занимают лейкозы. Роль АМФК в развитии лейкозов малоизучена, однако известно, что уровень базальной активности АМФК в лейкозных клетках зависит от стадии заболевания и развития резистентности опухолевых клеток. Применение модуляторов АМФК в составе комбинированной терапии рассматривается как перспективный метод лечения онкологических заболеваний. Тем не менее, механизм действия таких соединений в большинстве своем остается неизвестным. Целью работы было изучение влияния низкомолекулярных активаторов АМФК на клеточные механизмы при лейкозах.

В работе были рассмотрены две клеточные линии лейкозов – хронического миелоидного лейкоза человека K562 и острого моноцитарного лейкоза человека THP-1. В качестве низкомолекулярных активаторов использовали соединения C24, A769662 и AICAR, которые вызывают активацию киназы по отличным механизмам в результате связывания с разными субъединицами АМФК. Клеточные линии обрабатывали соединениями в течение 48 часов, после чего проводили оценку экспрессии генов субъединиц АМФК методом ПЦР в режиме

реального времени, продукции белков субъединиц АМФК методом вестерн-блоттинга, а также активности трехсубъединичного комплекса АМФК по фосфорилированию ее мишеней. В результате исследования было показано, что АМФК-профиль в рассмотренных клеточных линиях различается, что в первую очередь прослеживается на уровне экспрессии генов субъединиц. Также показано, что исследованные активаторы оказывают разнонаправленное действие на АМФК. При обработке клеток С24 наблюдалось выраженное снижение экспрессии генов субъединиц АМФК по мере повышения концентрации активатора. В то же время А769662 действовал противоположным образом – обработка соединением привела к повышению уровней экспрессии генов АМФК в клетках.

Таким образом, в ходе работы были выявлены различия в действии активаторов АМФК на клетки лейкоза человека K562 и THP-1. Полученные данные позволяют говорить о потенциальной эффективности применения низкомолекулярных активаторов АМФК в комбинированной терапии лейкозов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 24-73-10221).

ИЗУЧЕНИЕ СИНЕРГИЗМА ПРОДИГИОЗИНА И РЕСВЕРАТРОЛА, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В МИКРОВЕЗИКУЛЫ, НА МОДЕЛИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКОГО ЧЕЛОВЕКА

Сарин П.Е.[1*], Науменко Е.А.[1], Гурьянов И.Д.[1]

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

E-mail: pashas0306@gmail.com*

Химиотерапия – эффективный и широко распространенный подход к лечению рака, при этом зачастую ведущий к развитию серьёзных побочных эффектов. В ряде случаев совместное применение нескольких препаратов оказывается эффективнее, чем монотерапия, что связано с эффектом синергизма. Бактериальный пигмент продигиозин (ПГ) и полифенольное соединение ресвератрол (РВ) являются перспективными препаратами за счёт своего селективного действия в отношении раковых клеток и низкой токсичности для здоровых клеток. Совместное применение ПГ и РВ, представляет перспективный подход к разработке эффективных таргетных противоопухолевых препаратов.

В ходе работы проведено выделение микровезикул с помощью цитохалазина В и ПГ с последующей загрузкой РВ из клеток HEK 293. Клетки карциномы легких человека (A549) инкубировали с микровезикулами 48ч. С помощью метода MTT проводили оценку ферментативной активности клеток.

Показано, что комбинация ПГ и РВ, продемонстрировала наиболее выраженное снижение метаболической активности клеток линии A549 — на 47,8% относительно контроля, что в 1,52 и 1,68 раза превышало эффект ресвератрола и продигиозина соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о повышении эффективности при совместном применении.

Оценка пролиферации продемонстрировала эффективность данных соединений. После 48 ч инкубации количество клеток в группе РВ снизилось в 1,14 раза относительно контроля, тогда как под

действием ПГ — в 13,2 раза. Комбинированное применение ПГ и РВ привело к снижению численности клеток в 10,9 раза относительно контрольной группы.

Несмотря на сопоставимое влияние ПГ и его комбинации с РВ на пролиферацию клеток, результаты МТТ-анализа свидетельствуют о более выраженном снижении метаболической активности при совместном применении данных соединений. Это позволяет предположить наличие синергетического взаимодействия продигиозина и ресвератрола, которое, в первую очередь, проявляется в подавлении клеточного метаболизма, а не в активации апоптотического пути в раковых клетках. Таким образом, полученные данные подтверждают синергизм действия ПГ и РВ и показывают эффективность инкапсулирования данных веществ в микровезикулы.

Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР ZEB1 РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА ХЕМОКИНА CCL2 В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Семёнов О.М.[1*], Дакс А.[1], Барлев Н.А[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: semyonov.somspb@yandex.ru*

Рак молочной железы является наиболее распространённым онкологическим заболеванием среди женщин в развитых странах. Вместе с этим, постановка диагноза на поздних стадиях развития патологического процесса при наличии метастаз в отдалённых органах значительно снижает шансы на благоприятный исход. Белок ZEB1 является одним из ключевых регуляторов процесса инвазии и диссеминации трансформированных клеток. При этом, процесс

метастазирования часто сопровождается привлечением в опухоль моноцитов крови с помощью хемокина CCL2, что приводит к снижению цитотоксического иммунного ответа. В данной работе на клеточных линиях рака молочной железы (РМЖ) человека, MCF-7 и MDA-MB-231, показано влияние ZEB1 на экспрессию гена хемокина CCL2.

Изучение цитокинового профиля кондиционированной среды клеток РМЖ люминального типа А с индуцируемой экспрессией гена ZEB1 с помощью мультиплексного иммуноферментного анализа (ИФА) показало наиболее сильное повышение уровня CCL2 на фоне других исследуемых цитокинов при позитивном статусе ZEB1. Более того, с помощью ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинга и ИФА было показано, что позитивный эффект ZEB1 на синтез CCL2 усиливался при обработке клеток MCF-7 с помощью TNF-α. Помимо этого, было проведено аналогичное исследование воздействия TNF-α на клетки РМЖ трижды-негативного субтипа, MDA-MB-231, с нокаутом гена, кодирующего ZEB1. Негативный статус ZEB1 приводил к полной потере экспрессии CCL2 клетками MDA-MB-231 даже при индукции провоспалительных сигнальных путей с помощью TNF-α. Эксперименты на вставках Transwell™ по изучению миграции макрофагов, дифференцированных из клеток THP-1, на кондиционированную среду указанных выше клеток РМЖ продемонстрировали биологический эффект взаимосвязи ZEB1 – CCL2. Для обоих линий позитивный статус ZEB1 способствовал более интенсивной миграции THP-1. Помимо этого, прижизненная микроскопическая съёмка всех указанных ранее клеток РМЖ в условиях сокультивирования с THP-1 показала, что MCF-7 значительно повышают миграционную активность в присутствии макрофагов при позитивном статусе ZEB1.

Такие результаты демонстрируют роль ZEB1 в формировании положительной петли обратной связи между метастазирующими клетками РМЖ и макрофагами посредством CCL2.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-15-00428).

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К HMGB1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ КОМПЛЕКСА С HSP70

Симоненко Л.А.[1*], Марченко Д.М.[1], Михайлова Е.Р.[1]
Маргулис Б.А.[1], Гужова И.В.[1]

1. ФГБУН «Институт цитологии РАН»,Санкт-Петербург, Россия

E-mail: lida.simonenko.04@inbox.ru*

Белок HMGB1 является ключевым медиатором воспаления и перспективным биомаркером при различных патологиях, включая аутоиммунные заболевания и сепсис. Исследования показывают, что HSP70 и HMGB1, высвобождаясь из погибающих под действием химиотерапии опухолевых клеток, формируют комплекс, который действует как аутокринный фактор роста, стимулируя пролиферацию выживших клеток. Следовательно, получение специфических антител к HMGB1 необходимо как для фундаментальных исследований его роли в патогенезе, так и для разработки диагностических тест-систем.

Цель исследования – получение поликлональных антител к рекомбинантному белку HMGB1, их иммунохимическая валидация и оценка способности детектировать комплекс HMGB1 с HSP70 *in vitro*.

Мышей линии BALB/c в количестве 8 особей иммунизировали рекомбинантным белком HMGB1 согласно стандартной схеме. Наличие специфических антител в сыворотках животных оценивали с помощью непрямого ИФА и иммуноблоттинга. Способность полученных антител распознавать комплекс белков HSP70-HMGB1, полученный *in vitro*, оценивали посредством “сэндвич”-ИФА с использованием кроличьих поликлональных антител к белку HSP70.

В результате иммунизации у 5 из 8 первично иммунизированных мышей был зарегистрирован положительный гуморальный ответ на антиген. Наиболее перспективными признаны сыворотки двух мышей, показавшие последовательное увеличение оптической плотности при титровании в ИФА и способность окрашивать специфические полосы вестерн-блота. При анализе комплексов HSP70-HMGB1 посредством “сэндвич”-ИФА уровень сигнала для обеих сывороток был выше, чем при детекции отдельных белков, достигая максимума при эквимолярном соотношении 1:1.
Полученные в работе антитела могут быть использованы в дальнейшей разработке иммунологических тест-систем для детекции HMGB1 и его комплекса с HSP70, а также в исследовательских задачах, посвященных изучению роли HMGB1 как алармина в онкологических заболеваниях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-15-00288).

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО КОМПЛЕКСА HSP70-HMGB1 НА РЕПОПУЛЯЦИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИЙ РАЗЛИЧНОГО ГИСТОГЕНЕЗА

Соколова А.В.[1,2*], Марченко Д.М.[1], Михайлова Е.Р.[1], Маргулис Б.А.[1], Гужова И.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: sokolov_a77@bk.ru*

Высокая частота рецидивов злокачественных новообразований во многом обусловлена реактивацией опухолевого роста под действием молекул, высвобождающихся из погибающих клеток — паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMP). Ключевыми

представителями DAMP являются белок теплового шока HSP70 и высокоподвижный негистоновый ядерный белок HMGB1, которые способны под действием химиотерапевтического стресса на опухолевые клетки формировать устойчивый внеклеточный комплекс. Целью данной работы стало изучение влияния комплекса HSP70-HMGB1 на репопуляцию опухолевых клеток.

Исследование проводили на опухолевых клетках четырех линий человека различного гистогенеза: HCT-116 (аденокарцинома толстой кишки), HOS (остеосаркома), HN (гипернефрома) и PC-3 (аденокарцинома предстательной железы). В качестве индуктора высвобождения комплекса во внеклеточную среду использовали химиотерапевтический агент оксалиплатин в концентрации 100 мкМ. Детекцию комплекса HSP70-HMGB1 осуществляли методами иммунопреципитации с последующим вестерн-блоттингом и иммуноферметного анализа в вариации “сэндвич”. Влияние комплекса на скорость репопуляции оценивали с помощью MTT-теста.

По результатам работы установлено, что воздействие оксалиплатина на опухолевые клетки индуцирует высвобождение комплекса HSP70-HMGB1 во внеклеточное пространство для всех проанализированных клеточных линий. Показано, что данный комплекс оказывает положительное влияние на скорость репопуляции опухолевых клеток.

Таким образом, комплекс HSP70-HMGB1, выделяющийся из опухолевых клеток в ответ на химиотерапевтическое воздействие, является одним из ключевых факторов, стимулирующих их репопуляцию. Данный комплекс может рассматриваться как перспективный прогностический маркер риска развития рецидива и потенциальная мишень для противорецидивной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № № 26-15-00288).

СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛЕЙ ОПУХОЛЕЙ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ, ТАРГЕТНЫХ К БЕЛКУ АКТИВАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ-α

Соловьева С.В.[1,2*], Терехина Л.А.[1], Пиневич А.А. [1,2], Самойлович М.П. [1,2], Шашкова О.А.[1]

1. *ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова», Санкт-Петербург, Россия*
2. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: sonyasoloveva79702@gmail.com*

Белок активации фибробластов-α (FAP) – биомаркер фибробластов микроокружения солидных опухолей. Гиперэкспрессия FAP в строме опухоли и его участие в опухолевой прогрессии обусловили разработку таргетных препаратов для диагностики и терапии злокачественных новообразований разного гистогенеза. Моделями для их тестирования могут служить генно-модифицированные опухолевые клетки мыши, несущие на мембране FAP человека. В отличие от первичных культур и иммортализованных линий опухолевых клеток человека, такие клетки позволяют создавать опухолевые модели у иммунокомпетентных мышей. Помимо этого, преимуществом данного подхода является возможность получения клеточных штаммов с разным уровнем экспрессии биомаркера.

Цель работы – создание моделей опухолей, экспрессирующих FAP человека, у иммунокомпетентных мышей для оценки эффективности таргетных препаратов.

Методами молекулярного клонирования получили ретровирусный и транспозонный векторы, кодирующие *FAP* человека. В качестве основы для создания рекомбинантных клеток была выбрана мышиная линия опухолевых клеток CT26 (карцинома кишечника мыши Balb/c). Для генетической модификации клеток использовали метод ретровирусной трансдукции или кальций-фосфатной трансфекции. Отбор клеток, экспрессирующих FAP человека,

проводили с помощью сортировки методом проточной цитофлуориметрии с последующим культивированием в присутствии селективного антибиотика. Экспрессию целевого биомаркера в полученных штаммах подтверждали методами ПЦР в режиме реального времени и проточной цитофлуориметрии. Для создания моделей опухолей клетки вводили подкожно мышам Balb/c, содержащимся в условиях конвенционального вивария.

Созданы два штамма клеток CT26, несущих на мембране FAP человека (CT26-FAP). При сопоставимом уровне активности гена (ΔCt = 0,48 и 0,63) штаммы различались по количеству клеток, экспрессирующих биомаркер (83% и 24% соответственно). Плотность антигена на мембране у штамма с большей долей FAP^+-клеток была на порядок выше. Оба штамма показали 100% прививаемость при подкожной имплантации мышам Balb/c.

Таким образом, получены опухолевые клетки мыши, экспрессирующие FAP человека, которые позволяют оценивать эффективность таргетных препаратов при разной плотности белка-мишени на мембране. Клетки формируют солидные опухоли у иммунокомпетентных мышей в условиях конвенционального вивария.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ №1023022200055-4-3.2.21;3.1.3.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ШАПЕРОН-ОПОСРЕДОВАННОЙ АУТОФАГИИ И ПОИСК СПОСОБОВ ЕЁ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРИ РЕЦИДИВЕ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

Солонинка З.И.[1], Кузнецова Л.С.[1], Моршнева А.В.[1], Мукхерджи Д.[2], Гужова И.В.[1], Маргулис Б.А.[1], Лазарев В.Ф.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Институт Бозе, Калькутта, Индия*

E-mail: soloninkazlata@gmail.com*

Одной из основных причин рецидива опухолевого роста является остаточная после лечения популяция клеток. Известно, что такие резистентные клетки способны активировать различные защитные механизмы, которые могут способствовать приобретению ими более злокачественного фенотипа. Одним из возможных механизмов является шаперон-опосредованная аутофагия (ШОА). ШОА представляет собой селективный способ деградации белков, несущих аминокислотный мотив KFERQ. Центральным белком в данном процессе является лизосомальный белок LAMP2A.

ШОА способствует выживанию опухолевых клеток в условиях стресса, помимо этого ранее было показано, что её чрезмерная активация связана с резистентностью клеток к терапии. Тем не менее, на данный момент взаимосвязь между рецидивом и ШОА изучена недостаточно.

Целью данной работы стало изучение активации ШОА у резистентных клеток и поиск способов её ингибирования.

Изучение ШОА проводилось на клеточных линиях колоректального рака (КРР) HCT-116-luc и HCT-116/ox-luc, чувствительной и устойчивой к воздействию оксалиплатина соответственно.

С помощью количественной ПЦР и вестерн-блоттинга мы показали, что у устойчивых клеток повышены экспрессия гена и уровень белка LAMP2A. Затем при помощи метода лентивирусной трансдукции мы создали клеточную линию HCT-116-TET-KFERQ-GFP, в которой белок KFERQ-GFP находится под контролем

тетрациклинового промотора. На полученной линии мы проверили предполагаемые ингибиторы ШОА, являющиеся низкомолекулярными соединениями углеводной природы. Ранее эти соединения были синтезированы нашими коллегами-химиками из института Бозе. Мы показали, что выбранные соединения действительно снижают функциональную активность ШОА. На последнем этапе работы мы провели оценку комбинированной терапии синтезированных соединений с оксалиплатином. Мы показали, что совместное действие ингибиторов ШОА и оксалиплатина оказывало более выраженный противоопухолевый эффект, чем монотерапия оксалиплатином, причем как на чувствительных, так и на устойчивых клетках.

Таким образом, мы не только продемонстрировали, что у резистентных клеток повышен базальный уровень ключевого белка ШОА - LAMP2A, но и показали, что ингибирование ШОА повышает эффективность терапии оксалиплатином. Полученные данные могут поспособствовать созданию более эффективных методов лечения КРР.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-15-00288).

МЕТАБОЛОМНЫЙ ПРОФИЛЬ МОДЕЛЬНЫХ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ

Сударских Т.С.[1,2*], Ларионова И.В.[1,2], Кжышковска Ю.Г.[1,3]

1. *ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия*
2. *НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск, Россия;*
3. *Гейдельбергский университет, Мангейм, Германия*

E-mail: tanya-sudarskih@mail.ru*

Введение. Макрофаги — это клетки врожденной иммунной системы, обладающие высокой пластичностью, что обуславливает их возможность менять поляризацию под воздействием различных факторов. Так, факторы, секретируемые опухолевыми клетками, влияют на метаболизм опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ), что может приводить к прогрессированию рака.

Материалы и методы. Кондиционированную среду для стимуляции модельных ОАМ получали при культивировании клеточных линий 4-х типов рака: рака молочной железы (MCF7), колоректального рака (SW827), рака яичников (SKOV3) и рака простаты (PC3). Моноциты выделяли из лейкотромбослоя крови здоровых доноров и культивировали в среде X-VIVO с добавлением M-CSF, дексаметазона, IL-4 и опухолевого супернатанта. Определение метаболомного профиля ОАМ проводили посредством ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Результаты. При оценке липидного профиля в макрофагах MCF7 уровни фосфатидилглицеролов и сфингомиелинов статистически значимо были выше. В макрофагах PC3 повышался уровень фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилхолинов, но уменьшался уровень церамидов и фосфотидилинозитолов. Уровень некоторых кардиолипинов и фосфатидилхолинов как возрастал, так и снижался в макрофагах PC3. В макрофагах SKOV3 уровни кардиолипинов и плазменил фосфатидилэтаноламинов росли, а плазманил фосфатидилхолинов падали. Уровни церамидов, окисленных кардиолипинов, фосфатидилхолинов были повышены, а уровни

плазменил фосфатидилэтаноламинов были понижены в макрофагах SW837. Уровень некоторых кардиолипинов как возрастал, так и снижался в макрофагах SW837.

При оценке аминокислотного профиля уровень аргинина статистически значимо был ниже, а цитруллина в 3,8 раз выше в макрофагах MCF7. Уровень 4-аминобутировой кислоты в макрофагах PC3 статистически значимо был выше в 1,78 раз. Уровень аланина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глицина, гистидина, серина и тирозина был выше более чем в 1,5 раза в макрофагах SW837, в которых также был повышен уровень орнитина и треонина.

Выводы. Макрофаги SW837 в сравнении с ОАМ других типов рака характеризовались наиболее активированным аминокислотным и липидным профилем. В макрофагах PC3 отмечалось снижение уровня наибольшего количества липидов по сравнению с ОАМ других типов рака. Макрофаги SKOV3 отличались отсутствием статистически значимых различий в аминокислотном профиле по сравнению с ОАМ других типов рака. Понимание метаболических изменений в ОАМ позволит предложить новые терапевтические стратегии для лечения конкретных типов рака.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект №25-25-01001).

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К БЕЛКОВОМУ КОМПЛЕКСУ HSP70-HMGB1

Сычев А.А.[1,2*], Соколова А.В.[1,3], Львов А.В.[1,4], Марченко Д.М.[1], Михайлова Е.Р.[1], Маргулис Б.А.[1], Гужова И.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *СПбАУ РАН имени Ж.И. Алферова, Санкт-Петербург, Россия*
3. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт», Санкт-Петербург, Россия*
4. *ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет имени А И. Герцена», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: sicheff.anton@yandex.ru*

Белки HSP70 и HMGB1 являются важными сигнальными молекулами, участвующими в регуляции воспалительных процессов и иммунного ответа. Кроме того, они участвуют в патогенезе онкологических заболеваний. При высвобождении во внеклеточную среду HSP70 и HMGB1 способны формировать белковый комплекс, стимулирующий пролиферацию опухолевых клеток, выживших после химиотерапии, тем самым способствуя рецидиву. Получение специфических поликлональных антител к комплексу HSP70-HMGB1 необходимо для фундаментальных исследований в области молекулярного сигналинга и создания диагностических тест-систем. Цель работы — получение поликлональных антител к белковому комплексу HSP70-HMGB1 и оценка их специфичности методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА).

Иммунизацию проводили на 7 особях мышей линии BALB/c комплексом HSP70-HMGB1, полученным *in vitro* путем смешения рекомбинантных человеческих белков HSP70 и HMGB1 в эквимолярном соотношении 1:1. Оценку специфичности сывороток выполняли методом непрямого ИФА. В лунки планшета сорбировали комплекс HSP70-HMGB1, а также отдельно белки HSP70 или HMGB1. Конечная концентрация каждого антигена составляла 5 мкг/мл.

В результате иммунизации у двух животных зарегистрирован выраженный гуморальный ответ как к комплексу HSP70-HMGB1, так и к его индивидуальным компонентам. Проверка на неспецифическое связывание с бычьим сывороточным альбумином показала, что полученные антитела не обладают способностью связываться с нецелевыми белками. В дальнейшей работе планируется использование данных мышей в качестве источника спленоцитов для создания гибридомной линии клеток для получения моноклональных антител к комплексу.

Полученные поликлональные антитела эффективно распознают комплекс HSP70-HMGB1 и его индивидуальные компоненты, что делает их перспективными при разработке иммунохимических тест-систем и дальнейшего изучения комплекса HSP70-HMGB1.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 26-15-00288).

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИМИТАЦИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ РЕАКТИВНЫМ МЕЗОТЕЛИЕМ ПРИ ВЫРАЖЕННОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОСНОВА И ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ИСТИННОЙ НЕОПЛАЗИИ

Тарасова А.А.[1,2*], Тюньков А.Д.[1,2]

1. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Ветеринарная клиника «Альтервет», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail*: serpcassiopeia@gmail.com

Мезотелиоциты — не терминально дифференцированные клетки серозных оболочек, сохраняющие выраженную фенотипическую пластичность. Повреждение серозной оболочки сопровождается снижением продукции IL-10 и повышением уровня IL-6 (Katz et al., 2019), который через путь JAK2/STAT3 индуцирует эпителиально-

мезенхимальный переход (ЭМП) (Xiao et al., 2017). В результате ЭМП мезотелиоциты приобретают цитологические признаки, отвечающие критериям злокачественности, оставаясь доброкачественными, что затрудняет дифференциальную диагностику реактивного мезотелия и карциномы.

Цель — определить, какие признаки специфичны для карциномы и отличают её от реактивного мезотелия, а какие отражают неспецифический клеточный ответ на повреждение.

Изучены выпоты животных (кошек и собак) трёх групп: карцинома, верифицированная гистологически/ИГХ (n=19); реактивная мезотелиальная гиперплазия (РМГ), гистологически подтверждённая (n=8); диагностически неопределённые случаи с высокой суммой критериев злокачественности (n=9) — гистология не проводилась, онкопоиск (УЗИ/рентген/КТ) отрицателен, клиническое выздоровление. Морфологическая оценка проведена методом световой микроскопии препаратов, окрашенных по Романовскому-Гимзе, слепым методом с последующей валидацией результатов. Оценены 11 критериев злокачественности по полуколичественной шкале.

Грубый гиперхромный хроматин, полиморфные ядрышки, вакуолизация и базофилия цитоплазмы выявлялись с высокой частотой как при карциноме (95–100%), так и при РМГ (88–100%), не позволяя различить эти процессы.

Наиболее специфичным признаком карциномы оказалось нарушение ядерно-цитоплазматического соотношения (ЯЦО) (100% против 12% при РМГ). Сочетание нарушения ЯЦО с отсутствием щёточной каймы мезотелиоцитов («skirt») выявляется со статистически значимо большей частотой в группе карцином по сравнению с РМГ: 74% против 12% (p=0.0085, Fisher's exact test). В диагностически неопределённой группе оба признака встречались реже и были ближе к РМГ (22% против 12% РМГ, p=1), что согласуется с благоприятным клиническим исходом.

Таким образом, большинство цитологических критериев атипии отражает неспецифическую реакцию мезотелия на повреждение и не

позволяет надёжно различить карциному и РМГ. Наиболее информативным признаком злокачественности является нарушение ЯЦО в сочетании с отсутствием щёточной каймы. Универсальность ЭМП указывает на необходимость пересмотра диагностической значимости традиционных критериев атипии при цитологическом исследовании выпотов.

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ НОСИТЕЛИ ЭНТЕРОВИРУСОВ

Ткаченко Д.В.[1*], Макарова А.А[1], Саркисова В.А[1]

1. *Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

E-mail: dariaa.tkachenkoo@gmail.com*

Использование онколитических вирусов (ОВ) в терапии злокачественных новообразований является новым перспективным подходом, сочетающим в себе прямой лизис опухолевых клеток и системную активацию иммунного ответа. Однако, при системном введении терапевтическая эффективность ОВ ограничена из-за неблагоприятного биораспределения и быстрой нейтрализации инфекционных вирусных частиц иммунной системой. Введение ОВ в составе клеток-носителей позволяет частично преодолеть эти ограничения, обеспечивая защиту и накопление вирусных частиц в очаге опухоли. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются одними из перспективных кандидатов на роль носителей ОВ благодаря низкой иммуногенности, а также способности к миграции в очаги гипоксии и воспаления, нередко присутствующие в солидных опухолях. Несмотря на ряд исследований, подтверждающих эффективность данного подхода, отсутствуют данные о применении МСК как носителей энтеровирусов.

В данной работе мы оценили возможность использования МСК пульпы зуба человека в качестве носителей полиовируса 1-го типа, эховируса 1-го типа, вирусов Коксаки A21 и A7, а также

энтеровируса B75. Методом проточной цитометрии был проведен анализ экспрессии хемокиновых и вирусных рецепторов. Репликативную активность вирусов в МСК оценивали в ходе кинетических исследований с количественной оценкой продукции инфекционного вируса. Жизнеспособность МСК после заражения оценивали с помощью резазуринового теста. Эффективность инфекции определяли посредством иммуноцитохимического окрашивания на капсидный белок VP3.

Было установлено, что МСК экспрессируют ряд вирусных рецепторов (CD155, CD54 и CD55) и пермиссивны ко всем исследованным энтеровирусам. Наблюдался существенный прирост инфекционного титра и последующий лизис клеток, начинающийся через 7 часов после инфицирования. Эффективность инфекции варьировалась в зависимости от вируса: наиболее высокий процент инфицированных клеток наблюдался для эховируса 1 типа и энтеровируса B75. Также было показано, что МСК экспрессируют ряд хемокиновых рецепторов: CXCR4, CCR1/2/5/7, что указывает на потенциальную способность к миграции в опухолевые очаги. В совокупности, полученные данные свидетельствуют о том, что МСК могут рассматриваться как перспективные носители для ряда энтеровирусов.

Работа выполнена при финансовой поддержке министерства науки и высшего образования РФ (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2030 годы, проект № 075-15-2025-519).

ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОМБИНАЦИИ ВАКЦИННОГО ШТАММА 17D ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ С РУКСОЛИТИНИБОМ В ОТНОШЕНИИ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Трачук К.Н.[1*], Бирюкова Ю.К.[1], Капранов В.А.[1], Назаренко А.С.[1], Орлова Е.А.[1], Колясникова Н.М.[1]

1. ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва, Россия

E-mail: trachuk_kn@chumakovs.su*

Цель: исследовать иммунотерапевтический потенциал комбинации вакцинного штамма 17D вируса желтой лихорадки с руксолитинибом в отношении рака поджелудочной железы на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Актуальность: рак поджелудочной железы (РПЖ) — одно из наиболее агрессивных новообразований с поздней диагностикой, высокой лекарственной резистентностью и низкой выживаемостью. Существующие методы лечения малоэффективны, что требует поиска новых терапевтических стратегий. Онколитическая вирусная терапия – перспективное направление, но её эффективность при РПЖ ограничена противовирусной защитой опухолевых клеток. Вакцинный штамм 17D вируса жёлтой лихорадки (17D ВЖЛ) имеет изученный профиль безопасности и выраженные иммуногенные свойства. Интерферон-зависимый путь JAK/STAT ограничивает репликацию онколитических вирусов. Ингибирование JAK1/2-киназ руксолитинибом может помочь преодолеть врождённую противовирусную защиту опухоли и усилить онколитический эффект виротерапии.

Методы: *in vitro* исследование цитопатического действия штамма 17D ВЖЛ в комбинации с руксолитинибом на панели клеточных линий РПЖ с помощью системы xCELLigence и репликативной активности вируса при помощи метода БОЕ. *In vivo* исследование онколитического и иммунотерапевтического эффекта комбинации

ВЖЛ 17D с руксолитинибом на сингенной мышиной модели РПЖ Pan02 (ИФА, ИГХ исследования).

Результаты: Однократная комбинированная терапия привела к увеличению времени дожития мышей до гуманной точки более чем в два раза по сравнению с контрольной группой. Через 2–3 недели после терапии наблюдался лизис опухолей в экспериментальной группе животных, что указывает на активацию адаптивного противоопухолевого иммунного ответа. Методом ИФА выявлены изменения уровней IFNα, IL-12 и TNFα в крови и опухолях. Методом ПЦР не обнаружено персистенции вируса в мозге и селезёнке мышей.

Выводы: Комбинация вакцинного штамма 17D ВЖЛ с руксолитинибом демонстрирует выраженную противоопухолевую активность, сопровождается признаками системной иммунной активации и не приводит к вирусной персистенции, что указывает на её потенциал как перспективной стратегии терапии рака поджелудочной железы.

Исследование выполнено в рамках ГЗ ФГАНУ «ФНЦИРИП имени М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), тема № FNZG-2024-0003.

ФОРМИРОВАНИЕ АССОЦИИРОВАННЫХ С ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНОЙ ЭПИШАПЕРОМОВ ОБЕСПЕЧИВАЕТ ИНВАЗИВНУЮ МИГРАЦИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Федоров В.С.[1,2,3*], Канева В.Д.[4], Кондратенко А.А.[4], Колесниченко Ю.В.[1], Лихоманова Р.Б.[1,2], Юдинцева Н.М.[1] Нечаева А.С.[2], Зиганшин Р.Х.[5], Шевцов М.А.[1,2,6]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *НМИЦ имени В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*
3. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный Университет Ветеринарной Медицины», Санкт-Петербург, Россия*
4. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный Технологический Институт», Санкт-Петербург, Россия*
5. *ФГБУН «ГНЦ Институт биоорганической химии РАН», Москва, Россия*
6. *Клиника rechts der Isar, Технический Университет Мюнхена, Мюнхен, Германия*

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

Белки теплового шока Hsp70 и Hsp90 гиперэкспрессируются при злокачественной трансформации, и играют роль в ключевых механизмах прогрессии заболевания. Ранее для цитозольного шаперона Hsp90 была предложена концепция эпишаперома — гиперсвязанной сети шаперонов, ко-шаперонов и клиентских белков, включающей, в частности, CDC37 и HOP. Учитывая вовлеченность мембранной формы шаперона Hsp70 (mHsp70) в процессы миграции и инвазии опухолевых клеток, можно предположить существование стабильных патогенетически значимых белковых комплексов, функционально сходных с эпишаперомом. В настоящей работе впервые продемонстрировано существование mHsp70-центричного мембранного эпишаперома на

поверхности клеток глиобластомы, а также показана его роль в регуляции миграции и инвазии опухолевых клеток.

Для выделения нативных комплексов разработана платформа AIMS (суперпарамагнитные наночастицы Fe_3O_4 с антителами к mHsp70 и АТФ/АДФ-зависимой элюцией интерактома). В ходе валидации платформы воспроизводимо получены палитры интерактома mHsp70 клеток глиобластомы. ЖХ-МС/МС и сетевой анализ (Cytoscape, STRING) идентифицировали консервативный эпишапером первичных культур глиобластомы, включающий Hsp70, Hsp90, ко-шапероны (DNAJA1, BAG2, STIP1), белки цитоскелета (актин, филамин, моезин), малые ГТФазы (RhoA, CDC42) и белки адгезии. Функциональное обогащение показало доминирование кластеров реорганизации актинового цитоскелета и фокальной адгезии. При этом образцы интерактома mHsp70 обладали высокой гетерогенностью и централизацией по сравнению с контролем (неопухолевыми клетками, МСК), что указывает на формирование эпишаперома. В субпопуляции $mHsp70^{High}$ (высокая экспрессия шаперона на мембране) выявлены уникальные белки (BAG6, DNAJB11, LGALS1, S100A6), ассоциированные с агрессивностью опухолей.

Экзогенный эпишапером стимулировал подвижность МСК, увеличивая их среднюю скорость с 9,8 до 32,7 мкм/ч, а также усиливал инвазию через модельную мембрану. Ингибиторы Hsp70 – PES (блокирует субстрат-связывающий домен) и JG-98 (нарушает нуклеотид-связывающий домен) – значимо подавляли этот эффект, указывая на дезорганизацию эпишаперома.

Таким образом, впервые охарактеризован ассоциированный с mHsp70 мембранный эпишапером как интегрированная функциональная единица, регулирующая подвижность и инвазивную миграцию опухолевых клеток. Выявлены его субпротеомы, узловые компоненты которых могут рассматриваться в качестве перспективных мишеней для комбинированной терапии глиобластомы.

НОВЫЕ ДИАМЕНОКАРБЕНОВЫЕ АЦИКЛИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПАЛЛАДИЯ (II) ИНДУЦИРУЮТ АУТОФАГИЮ В ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И УСТОЙЧИВЫХ К ОКСАЛИПЛАТИНУ КЛЕТКАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ЧЕЛОВЕКА HCT-116

Федотова К.А.[1*], Гнедина О.О.[1], Серебрянская Т.В.[2], Кинжалов М.А.[3], Иготти М.В.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Белоруссия*
3. *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: k1234390@gmail.com*

Колоректальный рак (КРР) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний. Несмотря на широкое клиническое применение оксалиплатина, эффективность терапии КРР часто ограничена развитием лекарственной устойчивости, что делает поиск новых хемосенсибилизирующих агентов актуальной задачей молекулярной онкологии. Ранее нами было показано, что новые диаминокарбеновые комплексы палладия (II) (Pd-ADC) обладают высокой цитотоксичностью и демонстрируют низкомикромолярные значения IC_{50} в отношении как чувствительных (HCT-116/S), так и устойчивых к оксалиплатину (HCT-116/R) клеток КРР человека. Однако точные молекулярные механизмы их действия пока остаются неизученными.

В ходе исследования установлено, что цитотоксическое действие Pd-ADC комплексов 1 и 5 на чувствительные и устойчивые к оксалиплатину клетки HCT-116 сопровождается значительным усилением интенсивности флуоресценции красителя LysoTracker Green, что указывает на активацию биогенеза и закисления лизосом в обеих сублиниях. На транскрипционном уровне воздействие комплексов Pd-ADC приводит к компенсаторному повышению

экспрессии генов, кодирующих ключевые маркеры аутофагии LC3 и p62/SQSTM1, свидетельствуя об активации данного процесса на уровне РНК. Данные вестерн-блоттинга показали, что инкубация клеток HCT-116/S и HCT-116/R с Pd-ADC приводит к накоплению как цитозольной LC3-I, так и липидированной формы LC3-II, участвующей в формировании мембран аутофагосом. Эти изменения происходят на фоне снижения уровня белка p62, связывающего подлежащие утилизации внутриклеточные субстраты, что характерно для активной деградации мишеней в аутолизосомах. Для подтверждения индукции полнофункционального аутофагического потока клетки обрабатывали Pd-ADC комплексами совместно с блокатором лизосомального слияния хлорохином. Совместная обработка приводила к кратному увеличению уровня белков LC3-II и p62 по сравнению с монотерапией, указывая на то, что Pd-ADC стимулируют именно формирование аутофагосом, а не блокируют их деградацию.

Таким образом, антипролиферативный эффект Pd-ADC комплексов 1 и 5 в клетках КРР обусловлен запуском цитотоксической аутофагии. При этом сформированные механизмы устойчивости сублинии HCT-116/R оказываются неэффективными против данного типа программируемой клеточной гибели, что открывает перспективы для преодоления лекарственной устойчивости КРР.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ и Санкт-Петербургского научного фонда (проект № 25-13-20028).

РОЛЬ МОНОЦИТОВ В ПРОБУЖДЕНИИ ДОРМАНТНЫХ КЛЕТОК РАКА ЛЕГКОГО

Фирагина С.Д.[1*], Микеладзе М.А[1], Кокорева Н.Е.[1], Гужова И.В.[1], Маргулис Б.А.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: Firaginasofia995@gmail.com*

Резистентность новообразований к противоопухолевой терапии обусловлена сохранением популяции дормантных клеток, способных переживать лечение и инициировать рецидив. Существенный вклад в репопуляцию опухоли вносит взаимодействие с ее микроокружением (МО), однако механизмы данного процесса изучены недостаточно.

Целью настоящей работы являлось исследование роли моноцитов в пробуждении дормантных клеток рака легкого и выявление молекулярных механизмов, регулирующих данный процесс.

Для достижения поставленной цели была разработана модель дормантности in vitro, исследовано влияние моноцитов на дормантные опухолевые клетки и определены молекулярные регуляторы их репопуляции. Дормантность индуцировали на клеточных линиях рака легкого A549 и H1299 посредством культивирования клеток в течение четырех суток в среде с содержанием 0,1% фетальной бычьей сыворотки. Формирование дормантного фенотипа сопровождалось снижением метаболической активности, остановкой клеточного цикла в фазе G0/G1, активацией аутофагии, а также повышением экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимного перехода (EMT) и стволовости. Для оценки влияния клеток микроокружения дормантные опухолевые клетки сокультивировали с моноцитоподобными клетками THP-1. Сокультивирование с THP-1 приводило к выходу опухолевых клеток из состояния покоя, что сопровождалось повышением экспрессии маркеров пролиферации (Ki67), EMT (TWIST, ZEB1) и стволовости (CD44, SOX2, NANOG), а также снижением экспрессии маркеров

аутофагии (ATG5, ULK1). Одновременно происходила поляризация клеток THP-1 в фенотип опухоль-ассоциированных макрофагов (TAM), что подтверждалось повышением экспрессии CD163 и Arginase-1, а также увеличением продукции цитокинов IL-6, TNF-α и MCP-1. Протеомный анализ выявил p38 как одного из ключевых белков, ассоциированных с сигнальным путем AMPK при формировании дормантного состояния. Подавление экспрессии p38 сопровождалось нарушением активации аутофагии, снижением экспрессии маркеров EMT и стволовости, а также уменьшением способности опухолевых клеток индуцировать поляризацию моноцитов в фенотип TAM.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что моноциты являются важным компонентом микроокружения, способствующим пробуждению дормантных клеток и формированию их агрессивного фенотипа. Сигнальный путь p38–AMPK представляет собой один из ключевых регуляторов этого процесса и может рассматриваться как перспективная молекулярная мишень для предотвращения рецидивов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект №26-74-00134).

ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ СЕКРЕТОМА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Шаповалова А.А.[1,2]*, Кригер Д.В.[1], Аксенов Н.Д.[1], Лихоманова Р.Б.[1], Шевцов М.А.[1], Михайлова Н.А.[1], Юдинцева Н.М.[1]

1. *ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия*
2. *Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: alenaspvlv@gmail.com*

Известно, что опухоль-ассоциированные фибробласты являются одной из потенциальных мишеней для терапии глиобластомы, наиболее распространенной формы злокачественных опухолей головного мозга. Клетки опухоли характеризуются повышенным уровнем экспрессии мембранной формы белка теплового шока mHsp70, который играет ключевую роль в прогрессировании заболевания. Целью данной работы была оценка влияния среды, кондиционированной клетками первичных культур мультиформной глиобластомы (МГБ) человека, на трансформацию нормальных не опухолевых клеток.

В исследовании использовали клетки первичных культур МГБ и клеток линии FetMSC (мезенхимные стволовые клетки из костного мозга человека) (Центр коллективного пользования «Коллекция культур позвоночных» Института цитологии РАН). В работе использованы методы конфокальной и прижизненной микроскопии, проточной цитометрии, transwell-тест. Оценивали влияние среды, кондиционированной клетками первичных культур МГБ, на уровень экспрессии mHsp70 и функциональные свойства клеток FetMSC в 2D и 3D условиях культивирования (сфероиды). В качестве контроля использовали стандартные условия культивирования клеток МГБ и FetMSC. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ. Статистический анализ

проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Было выявлено существенное увеличение уровня экспрессии mHsp70 у нормальных клеток под влиянием среды, кондиционированной клетками МГБ, по сравнению с контролями. При воздействии кондиционированной среды нормальные клетки быстрее формировали более плотные сфероиды, а при их последующей реактивации скорость миграции клеток из сфероидов была существенно выше, чем в контролях. Увеличение клеточной подвижности также подтверждено с помощью transwell-теста.

Таким образом, результаты демонстрировали активное влияние секретома первичных культур клеток МГБ на изменение уровня экспрессии mHsp70 клетками линии FetMSC и клеточную подвижность, что может свидетельствовать о приобретении ими проопухолевого фенотипа.

Финансирование работы поддержано Грантом в форме субсидии Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2025-482).

X МОЛОДЕЖНАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

Сборник тезисов
Школы-конференции для молодых ученых
Института цитологии РАН

12–16 октября 2026 года

Санкт-Петербург

Подписано в печать 12.10.2026. Формат 60×84/16. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 28,0. Тираж 16. Заказ 2793.

Отпечатано с готового оригинал-макета, предоставленного оргкомитетом,
в Издательско-полиграфическом центре Политехнического университета.
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29.
Тел.: (812) 552-77-17; 550-40-14.