

Гены & Клетки

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



**VII МОЛОДЁЖНАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ
по молекулярной и клеточной биологии
Института цитологии РАН**

Санкт-Петербург, 12–15 октября 2020 г.

www.genescells.ru

ИНСТИТУТ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

ISSN 2313-1829

SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL

Genes & Cells

Vol. XV, №3, Приложение, 2020

© Human Stem Cells Institute, 2020

ISSN 2313-1829

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Гены & Клетки

Том XV, №3, Приложение, 2020

Журнал рекомендован ВАК Министерства образования
и науки РФ для публикации основных научных
результатов диссертаций на соискание
ученой степени доктора и кандидата наук

Журнал включен в российские и международные
библиографические и реферативные базы данных:
eLIBRARY (www.elibrary.ru), Scopus (www.scopus.com)

EDITORIAL COUNCIL

Editor-in-Chief

R.V. Deev
Human Stem Cells Institute (Moscow)
I.I. Mechnikov Saint-Petersburg State Medical University (Saint-Petersburg)

Executive Editor

I.Y. Bozo
Histografit, LLC (Moscow)
A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia (Moscow)

Editorial Board:

B.V. Afanasiev
I.P. Pavlov Saint-Petersburg State Medical University (Saint-Petersburg)

V.S. Akatov
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS (Pushchino)

V.P. Baklaushev
Federal Scientific and Clinical Center, FMBA of Russia (Moscow)

A.S. Bryukhovetsky
State Medical University of Russia (Moscow)

R.K. Chailakhian
N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Moscow)

I.A. Chekmareva
A.V. Vishnevskiy Institute of Surgery (Moscow)

V.S. Chirsky
S.M. Kirov Military Medical Academy (Saint-Petersburg)

G.D. Dalgatov
Federal Scientific Clinical Center of Otorhinolaryngology FMBA of Russia (Moscow)

M.I. Davydov
Medsi, LLC (Moscow)

A.A. Doctorov
Research and Training Center of Biomedical Technologies RRIMAP of RAAS (Moscow)

P.A. Dyban
Scientific Research Institute of Experimental Medicine, (Saint-Petersburg)

V.G. Gololobov
S.M. Kirov Military Medical Academy (Saint-Petersburg)

Y.P. Gribunov
Central Clinical Hospital with Outpatient Health Center of the Business Administration for the President of the Russian Federation (Moscow)

A.A. Gumerova
Kazan (Volga region) Federal University (Kazan)

R.E. Kalinin
I.P. Pavlov Ryazan State Medical University (Ryazan)

A.P. Kiasov
Kazan (Volga region) Federal University (Kazan)

S.L. Kiselev
N.I. Vavilov Institute of General Genetics RAS (Moscow)

K.V. Kotenko
Corresponding member of the RAS (Moscow)

V.A. Kozlov
Research Institute of Clinical Immunology (Novosibirsk)

A. Kuliev
Florida International University (Miami, USA)

A.V. Kulikov
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS (Pushchino)

V.S. Komlev
A.A. Baykov Institute of Metallurgy and Materials Science, RAS (Moscow)

Editorial Board:

A.V. Bersenev (San Francisco, USA)
A.G. Chogovadze (Moscow)
A.Y. Efimenko (Moscow)
I.I. Eremin (Moscow)
G. Feichtinger (Leeds, United Kingdom)
M.S. Fominyh (Saint-Petersburg)
A.S. Grigoryan (Saint-Petersburg)
P.V. Kruglyakov (Saint-Petersburg)
P.I. Makarevich (Moscow)
Ch.M. Nasadyuk (Lviv, Ukraine)
I.V. Potapov (Moscow)
V.S. Sergeev (Saint-Petersburg)
R.G. Vasiliev (Kiev, Ukraine)
N.V. Tsupkina (Saint-Petersburg)

A.A. Maschan
D. Rogachev Federal Scientific and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow)

S.A. Matveev
N.I. Pirogov National Medical-Surgical Center (Moscow)

G.L. Mentkevich
N.N. Blokhin Institute of Children's Oncology (Moscow)

Sh.M. Mitalipov
Oregon Health and Science University (Beaverton, USA)

B.B. Moroz
A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia (Moscow)

I.A. Odintsova
S.M. Kirov Military Medical Academy (Saint-Petersburg)

N.A. Onishchenko
V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantation and Artificial Organs (Moscow)

O.V. Paklina
S.P. Botkin City Clinical Hospital (Moscow)

Ye.V. Parfyonova
Moscow State University (Moscow)

A.S. Pavliuk
Research Institute of Eye Diseases (Moscow)

Yu.A. Petrenko
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine (Kharkov, UA)

A.G. Popandopulo
V. Gusak Institute Emergency and Reconstructionist Surgery (Donetsk)

A.V. Prikhodko
Gemabank (Moscow)

S.A. Rummyantsev
N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow)

S.V. Sazonov
Ural State Medical University (Ekaterinburg)

N.S. Sergeeva
P.A. Herzen Moscow Oncological Research Institute (Moscow)

E.I. Shishatskaya
Institute of Biophysics SB RAS (Krasnoyarsk)

E.V. Skorobogatova
Russian clinical children hospital (Moscow)

I.A. Suchkov
I.P. Pavlov Ryazan State Medical University (Ryazan)

A.N. Tomilin
Institute of Cytology of RAS (Saint-Petersburg)

V.V. Tsymborg
«Biovitrum» Co. Ltd. (Moscow)

S.E. Voskanyan
A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia (Moscow)

S.M. Zakian
Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (Novosibirsk)

V.L. Zorin
Human Stem Cells Institute (Moscow)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Главный редактор

Р.В. Деев
Институт стволовых клеток человека (Москва)
Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И.И. Мечникова

Ответственный редактор

И.Я. Бозо
ООО «Гистографт» (Москва)
Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва)

Участники редакционного совета:

В.С. Акатов

Институт теоретической и экспериментальной
биофизики РАН (Пушино, Московская обл.)

Б.В. Афанасьев

Санкт-Петербургский государственный медицинский
университет им. акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург)

В.П. Баклаушев

Федеральный научно-клинический центр ФМБА России (Москва)

А.С. Брюховецкий

Российский государственный медицинский университет (Москва)

С.Э. Восканян

Федеральный медицинский биофизический центр
им. А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва)

В.Г. Гололобов

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)

Ю.П. Грибунов

Центральная клиническая больница с поликлиникой
Управления делами президента РФ (Москва)

А.А. Гумерова

Казанский (Приволжский) федеральный университет (Казань)

М.И. Давыдов

ООО «Медси» (Москва)

Г.Д. Далгатов

Федеральный научно-клинический центр
оториноларингологии ФМБА России (Москва)

А.А. Докторов

Научно-исследовательский и учебно-методический центр
биомедицинских технологий ГНУ ВИЛАР РАСХН (Москва)

П.А. Дыбан

Научно-исследовательский институт экспериментальной
медицины (Санкт-Петербург)

С.М. Закиян

Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск)

В.Л. Зорин

Институт стволовых клеток человека (Москва)

Р.Е. Калинин

Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова (Рязань)

А.П. Киясов

Казанский (Приволжский) федеральный университет (Казань)

С.Л. Киселев

Институт общей генетики РАН им. Н.И. Вавилова (Москва)

К.В. Котенко

Член-корреспондент РАН (Москва)

В.А. Козлов

НИИ клинической иммунологии (Новосибирск)

А. Кулиев

Международный университет Флориды (Майами, США)

А.В. Куликов

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (Пушино)

В.С. Комлев

Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН (Москва)

Редакционная коллегия:

А.В. Берсенев (Сан-Франциско, США)

Р.Г. Васильев (Киев, Украина)

А.С. Григорян (Санкт-Петербург)

И.И. Еремин (Москва)

А.Ю. Ефименко (Москва)

П.В. Кругляков (Санкт-Петербург)

П.И. Макаревич (Москва)

К.М. Насадюк (Львов, Украина)

И.В. Потапов (Москва)

В.С. Сергеев (Санкт-Петербург)

Г. Файштингер (Лидс, Великобритания)

М.С. Фоминых (Санкт-Петербург)

Н.В. Цупкина (Санкт-Петербург)

А.Г. Чоговадзе (Москва)

А.А. Масчан

Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева (Москва)

С.А. Матвеев

Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова (Москва)

Г.Л. Менткевич

НИИ детской онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина (Москва)

Ш.М. Миталипов

Орегонский университет здоровья и науки (Портленд, США)

Б.Б. Мороз

Федеральный медицинский биофизический центр им.

А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва)

И.А. Одинцова

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)

Н.А. Онищенко

Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных
органов им. академика В.И. Шумакова (Москва)

А.С. Павлюк

Российский национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова (Москва)

О.В. Паклина

Городская клиническая больница им. С.П. Боткина (Москва)

Е.В. Парфенова

Московский государственный университет (Москва)

Ю.А. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины (Харьков, Украина)

А.Г. Попандопуло

Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака (Донецк)

А.В. Приходько

Гемабанк (Москва)

С.А. Румянцев

Российский национальный исследовательский медицинский
университет им. Н.И. Пирогова (Москва)

С.В. Сазонов

Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург)

Н.С. Сергеева

Московский научно-исследовательский онкологический
институт им. П.А. Герцена (Москва)

Е.В. Скоробогатова

Российская детская клиническая больница (Москва)

И.А. Сучков

Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова (Рязань)

А.Н. Томилин

Институт цитологии РАН (Санкт-Петербург)

Р.К. Чайлахян

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Москва)

И.А. Чекмарева,

Институт хирургии им. А.В. Вишневского (Москва)

В.С. Чирский

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)

В.В. Цимберг

ООО «БиоВитрум» (Москва)

Е.И. Шишацкая

Сибирский федеральный университет (Красноярск)

Адрес редакции:

119333 г. Москва, ул. Губкина, д. 3, стр 2, а/я 373

Тел./факс: +7 (495) 734-91-70

E-mail: redaktor@celltranspl.ru

Присылать материал для публикации, ознакомиться
с правилами для авторов, оформить подписку можно
в Интернете по адресу: www.genescells.ru
+7(495) 646-80-76

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору
за соблюдением законодательства в сфере массовых
коммуникаций и охране культурного наследия

Свидетельство о регистрации

ПИ № 77 – 57156 от 11.03.2014 г.

ISSN 2313-1829

Электронная версия журнала www.genescells.ru

ISSN электронной версии: 2500-2562

Свидетельство о регистрации

Эл №ФС77-58034 от 08.05.2014 г.

Администратор сайта И.А. Яковлев

Верстка С.А. Климентовский

Подписано в печать 15.09.2020. Формат бумаги 60×84/8.

Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 12,5.

Тираж 100 экз. Заказ № 2599.

Отпечатано в типографии Book Jet, 390005, г. Рязань, ул. Пушкина,
д. 18, тел.: +7 (4912) 466-151, www.bookjet.ru

Полное или частичное воспроизведение материалов, содержащихся
в настоящем издании, допускается с письменного разрешения
редакции. Ссылка на журнал «Гены и клетки» обязательна.

VII МОЛОДЁЖНАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ
по молекулярной и клеточной биологии
Института цитологии РАН
12–15 ОКТЯБРЯ 2020 г.

Технические редакторы: Е.В. Тарасова, П.И. Макаревич, А.Ю. Ефименко, Н.Н. Шаталова, Р.В. Деев.

СОСТАВ ПРОГРАММНОГО КОМИТЕТА:

Председатель

ТОМИЛИН А.Н., член-корр. РАН, врио директора ИНЦ РАН

Заместитель председателя

НИКОЛЬСКИЙ Н.Н., академик РАН, научный руководитель ИНЦ РАН

МИХАЙЛОВА Н.А., д. б. н., заведующая Центром клеточных технологий, заместитель директора ИНЦ РАН

ОСТРОУМОВА О.С., д. б. н., заведующая Лабораторией моделирования мембран и ионных каналов, заместитель директора ИНЦ РАН

ГУЖОВА И.В., д. б. н., заведующая Отделом молекулярных и клеточных взаимодействий ИНЦ РАН

КОРНИЛОВА Е.С., д. б. н., заведующая Лабораторией динамики внутриклеточных мембран ИНЦ РАН

ВИШНЯКОВ И.Е., к. б. н., руководитель Группы Молекулярной цитологии прокариот и бактериальной инвазии Лаборатории цитологии одноклеточных организмов ИНЦ РАН

Мероприятие проводится при финансовой поддержке РФФИ, проект № 20-04-20003

Место проведения:

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4;

Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет имени Ж.И. Алфёрова РАН, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 8, корп. 3, лит. А

Контакты:

<http://www.incras.ru>

<https://lomonosov-msu.ru/rus/event/5934/>

E-mail: viikmu.incras@gmail.com

12 ОКТЯБРЯ 2020

БИОЛОГИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

О.Ю. Алексеева, П.И. Бобылёва, Е.Р. Андреева

АКТИВНОСТЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛ И СОДЕРЖАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МАКРОФАГАХ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ*ГНЦ РФ — Институт медико-биологических проблем РАН, г. Москва, Россия*

O.Yu. Alekseeva, P.I. Bobyleva, E.R. Andreeva

THE ACTIVITY OF INTRACELLULAR ORGANELLS AND THE CONTENT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN MACROPHAGE INTERACTING WITH MESENCHYMAL STROMAL CELLS*SSC RF — Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

Alekseeva.olgay@gmail.com

В настоящее время взаимодействие мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и моноцитов/макрофагов (МН/МФ) рассматривается как ключевой регуляторный механизм при повреждении ткани, которое связано с депривацией нутриентов и O_2 . МСК изменяют поведение мононуклеарных фагоцитов, индуцируя противовоспалительный (M2) фенотип. В связи с этим, активно изучаются механизмы, с помощью которых происходит изменение поляризации макрофагов после взаимодействия с МСК.

Целью данной работы являлось изучение эффектов короткого гипоксического воздействия на активность внутриклеточных органелл и содержание АФК в МН/МФ при сокультивировании с МСК.

МН выделяли из фракции мононуклеаров периферической крови человека, а МСК из жировой ткани человека и культивировали в стандартных условиях (5% CO_2 , 37 °C). Сокультивирование проводили в течение 6 дней — период, за который происходило созревание МН/МФ, после чего клетки подвергались короткому (24 ч) гипоксическому воздействию (1% O_2). Оценка активности внутриклеточных органелл проводили с помощью флуоресцентных зондов методом проточной цитофлуориметрии. Ранее мы показали, что МН/МФ в присутствии МСК проявляли признаки M2 поляризации, о чем свидетельствовало увеличение экспрессии CD163 и CD206, а также более высокая фагоцитирующая способность.

В условиях 20% O_2 при контактном и паракринном взаимодействии с МСК в МН/МФ наблюдалось увеличение средней интенсивности флуоресценции (СИФ) MitoTracker в 1,2 и 1,3 раза, соответственно. Это может говорить о более активном накоплении в МН/МФ зонда в результате увеличения количества активных митохондрий или повышения их трансмембранного потенциала. Лизосомальный компартмент МН/МФ характеризовался снижением СИФ LysoTracker в 2,4 раза при контактном взаимодействии с МСК. Содержание АФК в МН/МФ увеличилось в 2,4 и 1,9 раза при контактном и паракринном взаимодействии с МСК, соответственно.

После 24 часов экспозиции при 1% O_2 СИФ MitoTracker в МН/МФ уменьшилась на 20% в монокультуре, на 50% — при прямом и не изменилась

при паракринном контакте с МСК. Снижение СИФ LysoTracker при паракринном взаимодействии составило 1,3 раза, а при прямом контакте — 1,2 раза. СИФ АФК при паракринном взаимодействии и прямом контакте увеличилась в 2,2 раза и 1,7 раза, соответственно.

Таким образом, увеличение числа активных митохондрий и АФК в МН/МФ при сокультивировании с МСК может обеспечивать повышение МСК-индуцированной фагоцитирующей способности МН/МФ. При коротком гипоксическом стрессе снижается активность внутриклеточных органелл, тогда как содержание АФК в МН/МФ увеличивается.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 17-04-00942.

С.А. Антонов, Р.В. Тимошенко, Ю.С. Иванова, А.В. Бородкина, О.Г. Люблинская

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В КУЛЬТУРАХ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОМ И РЕПЛИКАТИВНОМ СТАРЕНИИ*Институт цитологии Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Россия*

S.A. Antonov, R.V. Timoshenko, Ju.S. Ivanova, A.V. Borodkina, O.G. Lyublinskaya

ALTERATION OF THE INTRACELLULAR HYDROGEN PEROXIDE LEVEL IN CULTURES OF HUMAN ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STEM CELLS DURING STRESS-INDUCED AND REPLICATIVE SENESCENCE*Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, St-Petersburg, Russia*

xink1xink1@mail.ru

Общеизвестно, что клеточное старение является важной составной частью организменного старения. Считается, что при старении уровень активных форм кислорода (АФК) в клетках повышается. Однако до сих пор неизвестно, как изменятся при старении уровень перекиси водорода — одного из важнейших внутриклеточных окислителей и медиатора редокс-зависимых сигнальных процессов. На сегодняшний день лучшим инструментом для детекции перекиси водорода в индивидуальных живых клетках являются генетически кодируемые биосенсоры на основе гомологов зеленого флуоресцентного белка GFP. Биосенсор HyPer, разработанный для этих целей в институте биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, позволяет детектировать субмикромольные концентрации H_2O_2 в различных компартментах клетки. Этот сенсор является рН-зависимым, и для контроля полученных результатов его создатели рекомендуют совместно с HyPer использовать нечувствительную к перекиси модификацию сенсора — SypHer, обладающую аналогичной рН-зависимостью. В настоящей работе проанализировано изменение внутриклеточного уровня H_2O_2 при

индукции клеточного старения в культурах эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека (ЭМСК 2804), инфицированных вирусными векторами vHyPer-cyto и vSyrHer-cyto. Исследовались эффекты стресс-индуцированного и репликативного старения ЭМСК. Программа стресс-индуцированного старения активировалась действием перекиси водорода H_2O_2 в диапазоне концентрации 50–200 мкМ. Изменение уровня внутриклеточной перекиси водорода в постаревших и контрольных клетках оценивали путем цитофотометрического анализа клеток, экспрессирующих биосенсоры vHyPer-cyto и vSyrHer-cyto в клеточной цитоплазме. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при старении наблюдается снижение концентрации H_2O_2 в клеточной цитоплазме, что может быть связано с понижением метаболической активности постаревших клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00994.

Н.А. Басалова^{1,2}, М.В. Балабан², А.О. Монакова¹, Г.Д. Сагарадзе², В.С. Попов¹, А.Ю. Ефименко^{1,2}

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ КЛЕТОК СПЕРМАТОГЕННОЙ НИШИ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

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

² Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

N.A. Basalova^{1,2}, M.V. Balaban², A.O. Monakova¹, G.D. Sagaradze¹, V.S. Popov¹, A.Yu. Efimenko^{1,2}

PHENOTYPIC PLASTICITY OF SPERMATOGONIAL STEM CELL NICHE CELLS IN CELL CULTURE IN VITRO

¹ Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

natalia_ba@mail.ru

Мужское бесплодие является серьезной медицинской проблемой, так как примерно в половине случаев имеет идиопатическую природу. Пациентам с идиопатическим течением болезней терапию подбирают эмпирически, что нередко оказывается малоэффективным. Таким образом, в настоящее время поиск эффективных способов восстановления мужской фертильности является актуальной задачей. Поскольку идиопатические нарушения могут быть обусловлены многими факторами, целесообразно исследовать возможность применения мультитаргетных лекарственных препаратов, биомедицинских клеточных продуктов и их производных в виде субстанции на основе секрета клеток для восстановления мужской фертильности. Однако разработка и стандартизация лекарственного препарата сложного состава требует установления основных молекул-эффекторов и мишеней *in vitro*.

Для этого в нашей лаборатории на основании данных литературы были выбраны и апробированы протоколы выделения и культивирования сперматогонимальных стволовых клеток (ССК), клеток Лейдига и клеток

Сертоли из семенников крысы, в которых варьировали различные параметры (время выделения, температура, состав ферментов, применение градиентного центрифугирования). Полученные культуры клеток были охарактеризованы методами морфометрического и иммуноцитохимического анализов, сохранение функциональной активности клеток было проверено с помощью ИФА и вестерн-блоттинга.

Нами были выбраны протоколы, позволяющие получить жизнеспособные чистые культуры за оптимальное время. Однако, при анализе на более поздних пассажах выделенные с помощью данных протоколов культуры клеток Сертоли и Лейдига экспрессировали маркеры, которые не присущи им в ткани, но свойственны их ближайшему окружению. Полученные результаты могут свидетельствовать как о незначительной контаминации полученных культур другими типами клеток, не заметной на ранних пассажах, так и о существенном влиянии условий культивирования на фенотип. На основании полученных данных можно предположить возможность перехода одного фенотипа клеток в другой как минимум, *in vitro*, что заставляет пересмотреть современные взгляды на пластичность данных клеток и сложившийся набор маркеров для их фенотипирования.

Детальное исследование обнаруженного феномена может указать на методические недостатки выделения и пассирования культур клеток из семенников. Кроме того, исследования возможности изменения фенотипа клеток микроокружения ССК *in vitro* могут указать на еще не открытые механизмы регуляции гомеостаза ССК и сперматогенеза.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 19-75-30007, выделение и культивирование клеток), РФФИ (№ 18-315-00403, реактивы для молекулярно-биологических исследований) и в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова с использованием оборудования, закупленного по Программе развития МГУ (молекулярно-биологические тесты).

А.В. Беляев¹, Т.Ю. Старкова¹, А.Н. Томилин^{1,2}

НЕГИСТОНОВЫЙ БЕЛОК HMGB3 В ХРОМАТИНЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

¹ Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

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

A.V. Belyaev¹, T.Yu. Starkova¹, A.N. Tomilin^{1,2}

HMGB3 PROTEIN IN THE CHROMATINE OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

t.starkova@incras.ru

В стволовых клетках мыши экспрессируются три негистонового белка семейства HMGB — HmgB1, HmgB2 и HmgB3. Эти белки характеризуются высокой гомологией как первичной структуры, так и пространственной организации ДНК-связывающих доменов. Основными отличиями в структуре данных белков является длина С-концевого фрагмента, что, по-видимому,

в совокупности с посттрансляционными модификациями и окислительно-восстановительным состоянием белков определяет различие выполняемых ими функций. Целью работы является исследование индивидуальной роли HmgB3 в хроматине эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши. С помощью CRISPR/Cas9-технологии мы получили и охарактеризовали ЭСК, нокаутные по HmgB3. Анализ полученных мутантов показал, что HmgB3-дефицитные клетки жизнеспособны и по фенотипу существенно не отличаются от контрольных клеток. Также мы не выявили существенных изменений в экспрессии маркеров плюрипотентности Oct4, Nanog и Klf4. В то же время направленная дифференцировка HmgB3^{-/-} ЭСК в нейрональном направлении *in vitro* показала существенную задержку темпов такой дифференцировки. Таким образом, полученные данные указывают на роль HmgB3 в нейрональных типах клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 18-04-01199_a).

**А.В. Бородкина¹, П.И. Дерябин¹, А.А. Грюкова¹,
А.Н. Шатрова¹, А.П. Домнина¹, И.В. Горелова²,
М.В. Рулев², Н.Н. Никольский¹**

НАКОПЛЕНИЕ СТАРЕЮЩИХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ОБУСЛАВЛИВАЕТ ДИСФУНКЦИЮ ЭНДОМЕТРИЯ

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
² ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

**A.V. Borodkina¹, P.I. Deryabin¹, A.A. Griukova¹,
A.N. Shatrova¹, A.P. Domnina¹, I.V. Gorelova²,
M.V. Rulev², N.N. Nikolsky¹**

ACCUMULATION OF SENESCENT STROMAL CELLS MEDIATES DYSFUNCTION OF ENDOMETRIUM

¹ Institute of Cytology RAS, St-Petersburg, Russia
² Almazov National Medical Research Centre, St-Petersburg, Russia

borodkina618@gmail.com

Сегодня убедительно продемонстрировано наличие взаимосвязи между накоплением стареющих клеток, дисфункцией тканей и прогрессией самых разнообразных патологий. Источником стареющих клеток в организме служат нормальные клетки, функционирование которых нарушается в результате стрессовых воздействий, повреждения ДНК, при длительном воздействии медиаторов воспаления и вследствие метаболических изменений.

В настоящей работе мы исследовали молекулярные механизмы взаимосвязи старения эндометриальных стромальных клеток (эСК) и функционирования ткани эндометрия. ЭСК являются основным компонентом стромы эндометрия и отвечают за циклическое восстановление функционального слоя и его гормон-индуцированную дифференцировку (децидуализацию), необходимую для имплантации эмбриона. На начальном этапе исследований мы сравнили линии первичных эСК, полученных от разных доноров, по способности к дифференцировке и экспрессии маркеров клеточного старения. Проанализировав широкий набор параметров, мы обнаружили четкую отрицательную корреляцию — линии эСК с наиболее выраженными признаками старения обладали

наименьшей способностью к гормон-индуцированной дифференцировке. Для изучения молекулярных причин выявленной корреляции мы использовали *in vitro* модель преждевременного старения эСК. Оказалось, что по сравнению с молодыми клетками стареющие эСК практически полностью утрачивали способность к децидуализации, в частности за счет снижения экспрессии рецепторов прогестерона и эстрогена и повышения уровня внутриклеточных АФК. Для более глубокого анализа молекулярных механизмов, обуславливающих нарушение децидуальной дифференцировки стареющих эСК, мы провели РНК-секвенирование. При анализе данных NGS мы выявили значительные изменения в профилях экспрессии ключевых «децидуальных» генов в стареющих эСК.

Наконец, мы проверили, могут ли стареющие эСК влиять на основную физиологическую функцию ткани эндометрия — восприимчивость к имплантации эмбрионов. Для реализации этой задачи мы использовали модель имплантации *in vitro*, подразумевающую ко-культивирование клеток хориокарциномы и дифференцированных эСК. Оказалось, что старение эСК негативно влияло на процесс имплантации, в частности нарушало прикрепление и инвазию модельных «бластоцист».

Полученные результаты являются первым свидетельством драматических последствий накопления стареющих клеток в ткани эндометрия и в перспективе могут лечь в основу разработки подхода для восстановления рецептивности эндометрия при лечении многократных неудач имплантации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-74-10038.

**М.А. Бутолина, К.А. Ветошкин, Е.А. Перфилова,
Е.Н. Калинина, М.В. Сарпова, И.А. Новоселова**
ИЗУЧЕНИЕ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЧЕНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК СТРОМЫ КОСТНОГО МОЗГА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров, Россия

**M.A. Butolina, K.A. Vetoshkin, E.A. Perfilova,
E.N. Kalinina, M.V. Sarpova, I.A. Novoselova**
STUDY OF BIODISTRIBUTION OF LABELED MESENCHYMAL CELLS OF THE BONE MARROW STROMA IN LABORATORY ANIMALS

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency

butolina.maria@yandex.ru

В настоящее время одним из перспективных направлений клеточной терапии является применение мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Изучение биораспределения клеток после введения в организм — важный этап доклинических исследований биомедицинского клеточного препарата [1]. Цель работы — оценить распределение меченых МСК у лабораторных животных.

В опытах использовали самцов лабораторных нелинейных мышей (n=20) в возрасте 6 мес. массой 19–21 г. Эксперименты проводили в соответствии с положениями

«Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). МСК выделяли из костного мозга мышей ($n=5$) по общепринятой методике. С учетом иммунологических свойств мезенхимальных клеток, подбор совместимых пар «донор-реципиент» не осуществляли. Клетки культивировали в среде α MEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (20%) в условиях 5% CO_2 и температуре 37 °С. Мечение МСК производили сукцинимидным эфиром дикарбоскифлуоресцеина по протоколу производителя. Меченые клетки вводили в хвостовую вену в количестве 1×10^6 / кг. Мышей выводили из эксперимента через 1 ($n=5$), 24 ($n=5$) и 72 ($n=5$) ч после введения взвеси клеток, извлекали сердце, легкие, печень, селезенку, почки. Выполняли гистологическую проводку биологического материала по общепринятому способу и готовили парафиновые блоки. Изучение срезов тканей проводили с использованием люминесцентного микроскопа Axio Scope A1 ($\times 100$, длины волн возбуждения — 475 нм, эмиссии — 530 нм).

Через 1 ч максимальное количество меченых МСК обнаруживали в легких (12–14 клеток в поле зрения, медиана $Me=13$), в меньшем числе — в почках (3–8 клеток в поле зрения, $Me=4$), в сердце (2–5, $Me=3$), в селезенке (2–3, $Me=2$), в печени (1–2, $Me=1$). Через 24 ч наибольшая концентрация детектируемых элементов выявлена в почках (3–6 клеток в поле зрения, $Me=4$), в остальных исследованных органах — менее 2 клеток в поле зрения. К концу эксперимента (72 ч) количество флуоресцирующих МСК в тканях животных значительно снизилось и составляло не более 1 клетки в поле зрения. Наблюдаемая динамика содержания меченых элементов в органах согласуется с опубликованными данными [2].

Таким образом, изучено биораспределение меченых МСК после внутривенного введения лабораторным животным. Исследуемые клетки элиминируются из тканей в течение 3 суток.

Работа выполнена при поддержке гранта ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере».

Литература:

1. Ткачук В. А., Нестеров А. Н., Литвинова Н.Ю. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов. М.: МГУ им. МВ Ломоносова. 2017.
2. Jasmin J., Jelicks LA., Tanowitz HB. et.al. Molecular imaging, biodistribution and efficacy of mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of Chagas disease. *Microbes Infect.* 2014; 16(11): 923–35

Ю.Д. Василец, К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева,
А.В. Комова, И.Б. Белоглазова,
Е.И. Ратнер, Е.В. Парфенова

ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА (TGF-BETA) УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ СБОРКИ 3D КАРДИАЛЬНЫХ СФЕРОИДОВ

ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр кардиологии»
Министерства Здравоохранения Российской
Федерации, Москва, Россия

Yu.D. Vasilets, K.V. Dergilev, Z.I. Tsokolaeva,
A.V. Komova, I.B. Beloglazova,
E.I. Ratner, E.V. Parfenova

TRANSFORMING GROWTH FACTOR (TGF-BETA) REGULATES THE ASSEMBLY OF 3D CARDIAL SPHEROIDS

National Medical Research Center of Cardiology,
Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow,
Russia

eleagnusom@gmail.com

В тканях организма человека взаимодействие клеток между собой и компонентами межклеточного матрикса реализует сеть биохимических и механических сигналов, имеющих важное значение для поддержания клеточного гомеостаза. Были предприняты многочисленные попытки разработать трехмерные модели клеточных культур для изучения их свойств и понимания механизмов регуляции клеточного микроокружения *in vivo*. Одной из таких моделей кардиального микроокружения являются кардиосферы (КС) — гетерогенная популяция прогениторных клеток сердца, которые способны самопроизвольно воссоздавать 3D микроокружение, подобное «клеточным нишам» миокарда, и обеспечивать сохранение межклеточных контактов, принципов метаболического и секреторного регулирования. Однако механизмы, регулирующие их формирование, остаются малоизученными.

Цель исследования: изучить влияние TGF-beta на сборку 3D кардиальных сфероидов.

В работе использованы образцы миокарда мышей C57Bl6. Для получения эксплантной культуры использовалась среда IMDM, 20% фетальной сыворотки теленка (ФСТ), глутамин, 2-меркаптоэтанол (МЭ), антибиотики; для сборки кардиосфер — комбинированная среда 35% IMDM/65% DMEM-F12, 3% ФСТ и ростовые факторы. Исследование иммунофенотипа проводили с помощью метода иммунофлуоресцентного окрашивания, экспрессии генов SNAI/SLUG — ПЦР в реальном времени.

Мы обнаружили, что клетки эксплантной культуры в соответствующих условиях способны формировать КС, представляющие собой кардиальные сфероиды, в центральной части которых локализуются клетки, экспрессирующие маркеры стволовых клеток Oct4 и c-kit, окруженные клетками мезенхимального фенотипа ($CD105^+$, $CD73^+$) и сосудистыми/кардиальными клетками-предшественницами ($Gata4^+$, $Pesam^+$, SMA^+). Пересадка КС в среду с высоким содержанием сыворотки способствует их «разборке» и получению 2D культуры клеток. Образование КС сопряжено с повышением экспрессии генов-индукторов эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) по сравнению с 2D культурой: SNAI (>5 раз) и SLUG (>7 раз). Добавление TGF-beta — классического индуктора ЭМП — приводило к активации сборки крупных и мелких сфероидов. Напротив, воздействие ингибитора SB431542 в комбинации с TGF-beta нарушало процесс

сфероидогенеза, что проявлялось в увеличении числа первичных клеточных скоплений и снижением количества полноценных 3D структур.

Таким образом, TGF-beta способствует сборке КС, которая сопровождается повышением экспрессии генов SNAI/SLUG, что указывает на возможное участие ЭМП в процессе их формирования. КС имеют сложную трехмерную организацию, сформированную разными типами клеток и белками внеклеточного матрикса, что позволяет их рассматривать в качестве 3D модели кардиального микроокружения *ex vivo* для биомедицинских исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-15-01368 и РФФИ № 18-015-00430.

Е.В. Викторова, Д.Г. Коровина

**ЖИРОВАЯ ТКАНЬ ОВЦЫ КАК ИСТОЧНИК
МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

*Федеральный научный центр — Всероссийский
научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени
К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко РАН, Москва, Россия*

E.V. Viktorova, D.G. Korovina

**SHEEP ADIPOSE TISSUE AS A SOURCE
OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM
CELLS**

*Federal State Budget Scientific Institution "Federal
Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia*

victorovaekaterina@gmail.com

Получение мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) сельскохозяйственных животных представляет большой интерес для ветеринарной регенеративной медицины. Основными источниками для выделения ММСК является костный мозг и жировая ткань (ЖТ). В связи с этим, целью работы было выделение из ЖТ овец клеток со свойствами ММСК. Биологический материал был получен в условиях вивария методом иссечения 2 грамм жира из подкожно-жировой клетчатки при местной анестезии с соблюдением всех правил асептики и антисептики. ЖТ в количестве трех образцов была получена от трех самцов в возрасте от 8–12 месяцев. Выделение, культивирование и характеристику ММСК ЖТ овец проводили по методике, разработанной нами ранее [1]. Оценка способности ММСК к направленной дифференцировке в адипо-, остео- и хондрогенном направлении *in vitro* изучали с использованием коммерческих наборов StemPro (Gibco, США) и дальнейшим окрашиванием специфическими красителями. В результате была получена популяция клеток со свойствами ММСК. Полученные клетки обладали фибробластоподобной морфологией, адгезией к культуральному пластику и клонообразующей способностью. Среднее значение времени одной цитогенерации составляло ($48 \pm 0,05$ ч) с митотическим индексом 3,4 %. При индукции к дифференцировке обладали способностью на 14–24-е сут формировать клетки жировой, костной и хрящевой тканей, что подтверждалось специфической окраской. Таким образом, нами было показано, что ЖТ овец является легкодоступным и перспективным источником для выделения клеток со свойствами ММСК. Полученные данные представляют интерес для дальнейшего развития ветеринарной регенеративной медицины.

Работа выполнялась в рамках НИР № 0578-2018-0006 «Создание новых клеточных систем с заданными свойствами на основе стволовых клеток млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных для ветеринарии, вирусологии и биотехнологии».

Литература:

1. Савченкова И.П., Эрнст Л.К., Гулюкин М.И. и др. Методические наставления по выделению мультипотентных мезенхимных стволовых клеток из тканей взрослых особей млекопитающих, изучению их свойств и признаков. В сборнике: Современные средства и методы обеспечения ветеринарного благополучия по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел. Москва, 2011: 304–314.

Е.С. Войнова, П.А. Тюрин-Кузьмин
**ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ
И ПРОЛИФЕРАТИВНО-
ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ
МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК
ПРИ ИХ СТАРЕНИИ**

*Московский государственный университет, Москва,
Россия*

E.S. Voynova, P.A. Tyurin-Kuzmin

**HORMONAL REGULATION AND
PROLIFERATIVE-DIFFERENTIAL POTENTIAL
OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN THEIR
AGING PROCESS**

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

voynovaes.pharm@gmail.com

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) располагаются в строме большинства тканей и являются стволовыми клетками взрослого организма. Они представляют большой интерес для современной науки в связи с их потенциальным использованием в регенеративной медицине. В качестве перспективных направлений рассматриваются применение их для аутологичной трансплантации и стимуляции эндогенных механизмов репарации и регенерации поврежденных тканей. Как стволовые клетки, они обладают способностью к самообновлению и дифференцировке — процессов, от которых зависит размер популяции МСК и ее регенеративный потенциал на протяжении жизни человека. Старение популяции стволовых клеток влияет как на пролиферативные свойства МСК, так и на их способность к дифференцировке. Ранее было показано, что так называемое «время удвоения» популяции как на ранних, так и на поздних пассажах выше у пожилых доноров. Более того, этот параметр значительно увеличивается с каждым последующим пассажем. Кроме того, отмечается снижение мультипотентности дифференцировки и проявление признаков репликативного старения.

В качестве моделей стареющих МСК нами использовались клетки, выделенные из доноров разного возраста, и продолжительное пассирование клеток в культуре. Митотическая активность, адиподифференцировка и гормональная регуляция клеток наблюдались в режиме реального времени на уровне одиночных клеток.

В процессе исследования удалось выяснить, что клетки как молодых, так и пожилых доноров, высаженные в большей плотности, эффективнее переходят в адиподифференцировку. Обнаружилось, что сесцентные клетки обладают меньшим потенциалом

к дифференцировке, а также теряют гормональную регуляцию данного процесса. Так, клетки молодых доноров на ранних пассажах эффективнее переходят в адиподифференцировку после стимуляции серотонином и хуже — после стимуляции норадреналином, в то время как сенесцентным клеткам ни один из данных эффектов не присущ. Помимо этого, в процессе старения меняется процент клеток, отвечающих на гормоны, и характер этих ответов.

В данной работе был выявлен ряд особенностей изменения свойств МСК в процессе их старения, понимание которых необходимо для контролируемого использования этих клеток в регенеративной медицине.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-315-80018.

Литература:

1. HE Gruber, S Somayaji, F Riley et al. J. Biotech Histochem. 2012.
2. Günter Lepperdinger and Stephan Reitinger. Stem Cell Aging: Mechanisms, Consequences, Rejuvenation. 2015.

И.Н. Воропаев¹, С.В. Пономарцев¹, М.Н. Гордеев¹,
Е.В. Потапенко¹, А.Н. Томилин¹.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЛЕЙКОЦИТАРНОГО АНТИГЕНА G (HLA-G) ИПС КЛЕТКАХ МЫШИ ГЕМОФИЛЬНОГО ФЕНОТИПА С АЛЬФОИДНОЙ ИСКУССТВЕННОЙ ХРОМОСОМОЙ ЧЕЛОВЕКА, СОДЕРЖАЩЕЙ ГЕН ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ 8 (FVIII)

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

I.N. Voropaev¹, S.V. Ponomartsev¹,
M.N. Gordeev¹, E.V. Potapenko¹, A.N. Tomilin¹.

OVEREXPRESSION GENE OF HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN G IN IPS CELLS OF HEMOPHILIC MOUSE WITH ALPHOID HUMAN ARTIFICIAL CHROMOSOME CARRYING FVIII GENE

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

voropaev18.95@gmail.com

Человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G) экспрессируется в плаценте и позволяет обеспечить иммунотолерантность материнского иммунитета к антигенным клеткам плаценты и плода[1]. Ранее было показано, что экспрессия HLA-G в раковых клетках способствует избеганию иммунного ответа[2]. Кроме того было показано, что экспрессия в трансплантируемых органах HLA-G также способствует их приживаемости[2].

Свойство HLA-G, подавлять реакцию иммунного-отторжения вселяет надежду на его использование для получения гипоиммуногенной линии ИПС клеток.

В данном исследовании нами были получены 4 линии клеток с гиперэкспрессией HLA-G. Две линии ИПС клеток мыши с гемофильным фенотипом экспрессирующие HLA-G1 и HLA-G5 соответственно. В данном случае гиперэкспрессия достигалась за счёт лентивирусной трансфекции, при этом трансген находился под промотором фактора элонгации трансляции 1 (промотор EF1- α). Также было получено 2 линии ИПС клеток гемофильной мыши с альфоидной искусственной хромосомой человека, содержащей фактора свёртывания 8 (IX α -FVIII)

с экспрессией HLA-G1 и HLA-G5 соответственно. При этом, гиперэкспрессия достигалась за счёт интеграции трансгена методом CRISPR/CAS9-knock-in в регион генома Rosa26. В данном случае трансген находился под промотором CAG. С помощью вэстерн блота мы показали, что оба метода позволяют обеспечить высокий уровень гиперэкспрессии. При этом, уровень экспрессии достигнутый за счёт CRISPR-knock-in выше чем за счёт лентивирусной трансфекции.

В дальнейшем планируется оценить эффект гиперэкспрессии HLA-G в цитотоксическом тесте *in-vitro*, а также провести трансплантацию ИПС клеток с гиперэкспрессией HLA-G мышам линии (C57BL/6) и оценить их приживаемость.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 18-04-01199 А.

Литература:

1. L. Ferreira, T. Meissner, T. Tilburgs et al.. HLA-G: At the Interface of Maternal-Fetal Tolerance. Trends in Immunology. 2017.
2. E. Carosella, N. Rouas-Freiss, D. Tronik-Le Roux et al.. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. Advances in Immunology. 2015. 127:33–144

С.О. Генинг¹, Т.В. Абакумова¹, Д.Р. Долгова¹,
А.А. Ризванов², И.И. Антонеева¹,
Д.У. Гафурбаева², А.Р. Рахматуллина²

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ФЕНОТИПА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

¹ Ульяновский Государственный Университет,
Ульяновск, Россия

² Казанский Федеральный Университет, Казань,
Россия

S.O. Gening¹, T.V. Abakumova¹,
D.R. Dolgova¹, A.A. Rizvanov², I.I. Antoneeva¹,
D.U. Gafurbaeva², A.R. Rakhmatullina²

HETEROGENEITY OF THE CIRCULATING TUMOR CELLS PHENOTYPE IN PATIENTS WITH OVARIAN CANCER

¹ Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

² Kazan Federal University, Kazan, Russia

sgening@bk.ru

Рак яичников (РЯ) имеет одни из наиболее высоких показателей смертности от злокачественных опухолей среди женщин в мире. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) играют важную роль в гематогенном, имплантационном метастазировании и развитии рецидивов рака. Ряд исследований демонстрирует наличие корреляций между фенотипом ЦОК и клиническим течением злокачественных заболеваний. Целью исследования была оценка фенотипа ЦОК у больных РЯ. Материалы и методы. Исследование включало первичных больных эпителиальным РЯ I-IV стадий FIGO, поступавших в Областной Клинический Онкологический Диспансер, г. Ульяновск в 2019–2020 г.г. Письменное информированное согласие, соответствующее принципам Хельсинкской декларации 2013 г., было получено от всех участниц исследования. Образцы крови были получены до противоопухолевого лечения. Используя метод проточной цитометрии (Cytotflex S (BECKMAN COULTER, USA)), мы оценили количество ЦОК эпителиального (CD45-/EpCAM

+/-виментин-) и мезенхимального (CD45-/EpCAM-/виментин+) фенотипов, а также присутствие ЦОК стволового фенотипа (CD45-/CD44+, CD45-/CD44+/ALDHhigh) в пересчете на 1 мл крови.

Результаты. Мы обнаружили в крови пациенток эпителиальные ЦОК (медиана 20; Q1-Q3 12,9–40,1 кл/мл) и мезенхимальные ЦОК (медиана 29; Q1-Q3 20,4–124,2 кл/мл). При подсчете отношения числа эпителиальных ЦОК к числу мезенхимальных мы обнаружили, что соотношение >1 наблюдается у больных с отсутствием асцита, отдаленных метастазов, распространения опухоли за пределы малого таза, тогда как соотношение ≤1 во всех случаях сопровождалось распространением опухоли. Кроме того, у больных с соотношением ЦОК >1 медиана уровня СА-125 до лечения составила 63 Ед/мл в сравнении с 352 Ед/мл при соотношении ≤1. Мы также установили наличие в крови больных РЯ III-IV стадий присутствие CD45-/CD44+ ЦОК (медиана 92; Q1-Q3 60,8–280,7 кл/мл). Козэкспрессия CD44+/ALDHhigh в ЦОК наблюдалась только в 1 образце.

Выводы. Количественное преобладание ЦОК мезенхимального фенотипа над эпителиальными у больных РЯ ассоциировано с менее благоприятными клиническими параметрами при первичной диагностике. У больных распространенным РЯ в крови присутствуют стволоподобные ЦОК фенотипа CD45-/CD44+.

Данная работа была поддержана грантом РФФИ № 19-315-90011.

П.А. Голубинская^{1,2}, М.В. Сарычева²,
М.В. Пузанов¹, Ю.Е. Бурда^{1,2}

ПРИМЕНЕНИЕ СЕКРЕТОМА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ АДЪЮВАНТНОГО АРТРИТА, ЭНДОТОКСИЧЕСКОГО ШОКА И КОЖНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ НА ЖИВОТНЫХ МОДЕЛЯХ

¹ ООО «Центр клеточных технологий Бирюч»,
с. Малобыково, Россия

² Белгородский государственный национальный
исследовательский университет, г. Белгород,
Россия

P.A. Golubinskaya^{1,2}, M.V. Sarycheva²,
M.V. Puzanov¹, Y.E. Burda^{1,2}

APPLICATION OF THE STEM CELL SECRETOME IN THE TREATMENT OF ADJUVANT ARTHRITIS, ENDOTOXIC SHOCK AND SKIN DISEASE ON ANIMAL MODELS

¹ "Center of Cell Technologies Biruch", I.I.c., Malobykovo
village, Russia

² Belgorod State National Research University,
Belgorod, Russia

polinapigeon@gmail.com

На сегодняшний день применение метаболитов мезенхимальных стволовых клеток (МСК) — актуальная область в регенеративной медицине. Целью исследования стало изучение эффективности секретомы МСК на моделях воспалительных заболеваний: адъювантного артрита, псориазиформного поражения кожи у крыс линии Wistar весом 200–260 г и эндотоксического шока у белых беспородных мышей весом 20–38 г.

Для моделирования артрита самкам крыс вводили 100 мкл полного адъюванта Фрейнда в плантарную

поверхность задних лап. Введение повторяли через неделю. Через 2 недели после первого введения наблюдался отёк задних лап, хромота. Затем в заднюю правую лапу подкожно вводили 100 мкл секретомы МСК, стандартизированный по количеству белка 1 мг/1 мл, в группе контроля — физраствор. Отёк лап измеряли с помощью электронного штангенциркуля. По показателям продольных и поперечных размеров лап крыс не было выявлено значимых различий между группами.

Для индукции эндотоксического шока применяли 500 мкг липополисахарида в физ. растворе, который вводили мышам внутрибрюшинно. После этого вводили 1 или 10 мкг секретомы МСК, в группе контроля — физраствор. Смертность мышей во всех группах была одинаковой.

В качестве индуктора псориазиформного поражения кожи использовали 1% имихимод в оливковом масле с 10% ДМСО, наносили 200 мкл суспензии на депилированную кожу верхней половины спины самцов крыс. На 4-е сутки развивалось воспаление с гиперемией, отеком кожи, шелушением. Купирование воспаления проводили ежедневным однократным применением крема, крема с секретомом МСК или фторцинолона. В опытной группе и в группе фторцинолона со 2 дня применения был выявлен положительный эффект — уменьшение клеточности препаратов кожи, толщины дермы. В отрицательном контроле выраженность воспаления снижалась незначительно. Таким образом, противовоспалительная активность комплекса гуморальных факторов секретомы МСК при местном применении способствует значимому снижению острого псориазиформного воспаления кожи. Это является основанием для дальнейшего изучения терапевтических эффектов секретомы МСК.

М.Н. Гордеев, Е.И. Бахмет,
А.А. Кузмин, А.Н. Томили

СОЗДАНИЕ РЕПОРТЕРНЫХ ЛИНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССА РАННЕЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт цитологии Российской
академии наук, Тихорецкий проспект 4, Санкт-
Петербург, 194064, Россия

M.N. Gordeev, E.I. Bakhmet,
A.A. Kuzmin, A.N. Tomilin

GENERATION OF REPORTER ESCS TO STUDY PROCESS OF EARLY DIFFERENTIATION

Institute of Cytology of the Russian Academy of Science
Tikhoretsky ave. 4, 194064 St-Petersburg Russia

sollussekundas@gmail.com

Плюрипотентные стволовые клетки, представленные во время эмбриогенеза в эпибласте, обладают уникальными возможностями дифференцировки. Они дают начало всем трем зародышевым листкам: нейроэктодерме, мезодерме и дефинитивной энтодерме, а также половым клеткам. *In vitro* аналогом плюрипотентных клеток эпибласта являются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). Таким образом, ЭСК являются прекрасной моделью для изучения процесса ранней дифференцировки. Одним из способов определения траектории дифференцировки является оценка экспрессии ряда маркеров, в частности для нейроэктодермы — Sox1, для мезодермы

—Brachyury, дефинитивной энтодермы — Foxa2. Для оценки экспрессии данных маркеров рядом преимуществ обладает подход, основанный на создании репортерных клеточных линий путем вставки флуоресцентных белков непосредственно в геном с помощью системы CRISPR/Cas9. Так, нам удалось встроить перед стоп-кодом гена Foxa2, через 2A-сайт, ген флуоресцентного белка EGFP. Наличие сайта 2A приводит к образованию двух отдельных белков, благодаря чему они не влияют на функции друг друга, но находятся в эквимоллярных соотношениях. Для гена T, который кодирует Brachyury, будет использован флуоресцентный белок tagBFP, а для Sox1 — tdTomato. Для проверки корректности работы нашей системы мы будем проводить направленные *in vitro* дифференцировки. Мы планируем получить систему для простого, точного и воспроизводимого анализа процессов ранней дифференцировки.

Работа поддержана в рамках РФФ № 17-14-01407 2017–2019.

Ю.С. Гречаная^{1,4}, Т.В. Машель², К.Э. Журенков^{3,4},
Ю.И. Хорольская⁴, О.И. Александрова⁴

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ РОГОВИЧНОГО ЛИМБА И СЛИЗИСТОЙ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ В УСЛОВИЯХ 3D КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В КОЛЛАГЕНОВОМ ГИДРОГЕЛЕ

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

² Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

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

⁴ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Y.S. Grechanaya^{1,4}, T.V. Mashel², K.E. Zhurenkov^{3,4},
Y.I. Khorolskaya⁴, O.I. Aleksandrova⁴

CORNEAL LIMBUS AND ORAL MUCOSA DERIVED STEM CELLS UNDER 3D CONDITIONS INSIDE COLLAGEN HYDROGEL

¹ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

² ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

³ St. Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

⁴ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

julia.grechanaya@yandex.ru

Эпителий роговицы является высокоорганизованной самообновляющейся прозрачной аваскулярной тканью, выполняющей защитную и оптическую функции. Гомеостаз эпителия роговицы поддерживают стволовые клетки (СК) роговичного лимба. Гибель этих клеток в результате различных патологий приводит к нарушению процесса эпителизации роговицы. Это состояние, называемое лимбальной недостаточностью (ЛН), характеризуется нарастанием на роговицу конъюнктивы с формированием бельма. Для терапии ЛН разрабатываются подходы к созданию биоинженерных конструкций (БИК), способствующих резепитализации роговицы после трансплантации. Перспективными являются скаффолды на основе коллагена — основного белка соединительной ткани организма. Клеточной составляющей таких БИК могут выступать СК роговичного лимба и слизистой ротовой полости.

Настоящая работа посвящена исследованию биосовместимости скаффолда на основе коллагенового

гидрогеля (КГ) и культивируемых внутри него СК роговичного лимба и слизистой ротовой полости кролика. Для приготовления скаффолдов использовали коллаген I типа, полученный из крысиных хвостов в конечной концентрации 2 мг/мл. В полученную смесь добавляли суспензию клеток в концентрации 2x10⁵кл/мл геля. В качестве клеточного компонента использовали меченые зелёным флуоресцентным белком (GFP) СК роговичного лимба и слизистой оболочки ротовой полости кролика. Клетки культивировали в КГ в течение двух месяцев. Жизнеспособность клеток оценивали по их морфологии, пролиферации, контракции гидрогелей и миграции из них клеток.

Итог работы показал, что высокая биосовместимость компонентов обеспечивает возможность применения КГ для 3D культивирования СК роговичного лимба и слизистой оболочки ротовой полости, что делает его перспективным для использования при создании БИК для резепитализации роговицы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90146.

А.А. Грюкова¹, П.И. Дерябин¹, А.Н. Шатрова¹,
И.В. Гужова¹, Б.А. Маргулис¹, А.В. Бородкина¹
РОЛЬ HSP70 В ВЫЖИВАЕМОСТИ СТАРЫХ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

A.A. Griukova¹, P.I. Deryabin¹, A.N. Shatrova¹,
I.V. Guzhova¹, B.A. Margulis¹, A.V. Borodkina¹

THE ROLE OF HSP70 IN SURVIVAL OF SENESCENT ENDOMETRIAL STROMAL CELLS

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

grukova77@mail.ru

На сегодняшний день известно, что накопление старых клеток в организме опосредует нарушения функционирования тканей и органов. В связи с этим, одним из активно развивающихся направлений в биологии старения сегодня является поиск и разработка соединений, селективно убивающих старые клетки и получивших название сенолитики. В этой области уже имеются примеры успешного использования таких агентов как *in vitro*, так и *in vivo*. Совокупность данных, полученных нашей исследовательской группой, свидетельствует в пользу того, что старение эндометриальных стромальных клеток (эСК) может приводить к дисфункции эндометрия. Мы предполагаем, что таргетное удаление старых клеток может также служить подходом для предотвращения их негативного влияния на свойства эндометриальной ткани. Ввиду этого, целью нашей работы был поиск потенциальной молекулярной мишени для элиминации старых эСК.

Согласно литературным данным старые клетки характеризуются высокой устойчивостью к гибели. На первом этапе мы проверили, отличается ли жизнеспособность молодых и старых эСК в условиях окислительного стресса, теплового шока, повреждения ДНК и индукции апоптоза. Как и ожидалось, старые клетки оказались более устойчивыми ко всем видам стрессов. Установив этот факт, мы сфокусировали внимание на изучении молекулярной основы повышенной устойчивости старых эСК

к воздействию стрессов. Нам удалось обнаружить, что базальный уровень белка Hsp70 в старых клетках выше по сравнению с молодыми эСК. Кроме того, увеличение экспрессии Hsp70 при обработке стрессами в старых эСК сильнее, чем в нормальных клетках. В связи с этим, мы проанализировали влияние ингибитора и активатора Hsp70, CL-43 и U-133, соответственно, на жизнеспособность молодых и старых эСК, в том числе в условиях стресса. Мы выявили, что индукция Hsp70 способствует повышению устойчивости старых клеток, в то время как подавление его активности снижает их выживаемость. Эти результаты позволяют нам заключить, что Hsp70 играет важную роль в обеспечении жизнеспособности старых эСК и может рассматриваться в качестве потенциальной мишени для запуска направленной гибели в старых клетках, а также в контексте последующей разработки сенолитиков.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-70008.

П.И. Дерябин¹, А.А. Грюкова¹, А.Н. Шатрова¹,
А.П. Домнина¹, И.В. Горелова²,
М.В. Рулев², А.В. Бородинкина¹

**ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ
МЕЖДУ СОСТОЯНИЕМ СТАРЕНИЯ
И СПОСОБНОСТЬЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВАТЬСЯ
ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
² ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

P. Deryabin¹, A. Griukova¹, A. Shatrova¹,
A. Domnina¹, I. Gorelova², M. Rulev², A. Borodkina¹

**A NEGATIVE CORRELATION BETWEEN
THE LEVEL OF SENESCENCE AND
THE DIFFERENTIATION CAPABILITY
OF ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STROMAL
CELLS**

¹ Institute of Cytology RAS, St-Petersburg, Russia
² Almazov National Medical Research Centre,
St-Petersburg, Russia

deryabin.pav@gmail.com

В настоящее время вклад клеточного старения в дисфункцию тканей стал общепризнанным. Более того, показано, что направленная элиминация стареющих клеток при помощи генноинженерных и фармакологических подходов оказывается эффективной для лечения ряда возрастных заболеваний.

Считается, что нарушение целостности и функционирования тканей в результате старения клеток происходит ввиду утраты ими способности дифференцироваться, потери их пролиферативной активности и нарушений их сигнального сообщения с клетками окружения. Большинство данных, раскрывающих эти механизмы, были получены *in vitro* в искусственных моделях индукции старения различными стимулами (репликативное, онкоген-индуцированное, стресс-индуцированное типы клеточного старения). Результаты наших предыдущих исследований стресс-индуцированного старения стволовых / стромальных клеток эндометрия человека (эСК) полностью совпадали с описанными выше сценариями. В данной работе мы применили более

физиологичный подход для проверки существования зависимости между состоянием старения эСК и их способностью дифференцироваться — комплексную оценку ряда первичных линий эСК, полученных от различных доноров, по уровню старения и выраженности реакции на стимуляцию дифференцировки.

Чтобы ответить на этот вопрос, эСК дифференцировались в тканеспецифичном децидуальном направлении, непосредственно отражающем их нативную функцию — прегравидарную трансформацию стромы матки, опосредующую имплантацию и приживание эмбриона. Децидуальный ответ клеток оценивали по общим маркерам — экспрессии генов *PRL*, *IGFBP1* и *FOXO1*, а также с использованием специальной репортерной трансгенной системы. Данная система функционирует на основе промотора, включающего специфичный для приматов связанный с беременностью транспозон *MER20*, так что накопление флуоресцентного белка, экспрессируемого под этим промотором, отражает интегративный децидуальный ответ. Клеточное старение оценивалось по активности β-галактозидазы, накоплению липофусциновых гранул, размеру клеток и экспрессии гена *CDKN2A*. Дальнейшая нормализация и кластеризация результатов выявили отчетливую отрицательную корреляцию между показателями децидуального ответа и маркерами старения среди анализируемых клеточных линий. Настоящие данные подтверждают результаты, полученные ранее с использованием модели индуцированного старения эСК *in vitro*, и подтверждают идею о том, что стареющие клетки *in vivo* могут вызывать дисфункцию тканей из-за нарушения способности дифференцироваться. Это наблюдение может также дополнительно учитываться с точки зрения диагностики и лечения женского бесплодия.

Работа выполнена в рамках проектов РФФИ № 20-34-70008 (выделение линий эСК, культуральная работа) и РФФИ № 19-74-10038 (молекулярно-биологическая работа).

Н.В. Едоменко^{1,2}, О.И. Александрова²,
М.И. Блинова²

**СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЭПИДЕРМИСА
КАК КОМПОНЕНТ БИОИНЖЕНЕРНОЙ
КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ РЕЭПИТЕЛИЗАЦИИ
КОЖИ**

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

**N.V. Edomenko^{1,2}, O.I. Aleksandrova², M.I. Blinova²
EPIDERMAL STEM CELLS AS A COMPONENT
OF ENGINEERED STRUCTURES FOR RE-
EPITHELIALIZATION OF THE SKIN**

¹ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia
² Institute of Cytology of the RAS, Saint-Petersburg, Russia

i14zar@yandex.ru

Кожа представляет собой сложную тканевую систему, состоящую из эпидермиса, дермы и гиподермы. Она выполняет ряд жизненно важных функций, которые обеспечивают нормальное функционирование всего организма. В случае повреждения кожи необходимо её скорейшее

восстановление. Ключевую роль в защитной функции кожи играет эпидермис, обладающий регенераторным потенциалом и способностью к самообновлению. Основную массу клеток эпидермиса составляют кератиноциты (КЦ). Гомеостаз эпидермиса поддерживают стволовые клетки (СК) эпидермиса: КЦ его базального слоя и СК волосяных фолликулов. Однако реэпителизация (РЭ) дефекта при обширных ожоговых повреждениях кожи остается главной проблемой, а её решением является дерматомная кожная пластика. Нехватка или отсутствие донорского материала для пластики побудило исследователей к разработке эквивалентов кожи (ЭК), состоящих из скаффолда и культивируемых клеток. Однако до сих пор нет ЭК, способного заменить аутопластику перфорированным кожным лоскутом. При повреждении кожи должна запуститься РЭ, однако она не может быть достигнута, пока не произойдет миграция эпидермальных СК из края раны и трансплантата к раневой поверхности. Признавая важность миграции СК эпидермиса при РЭ раны, нужно создать микроокружение, способствующее их миграции для быстрой РЭ. Роль микроокружения может играть скаффолд на основе коллагенового гидрогеля (КГ).

Настоящая работа посвящена введению в культуру СК эпидермиса и оценке возможности создания на их основе ЭК для РЭ кожи. Источником СК служил эпидермис биоптатов кожи век взрослых доноров. Клетки выделяли методом ферментативной дезагрегации ткани. Полученную первичную культуру пассировали и криоконсервировали на различных пассажах. Клетки характеризовали по основным стволовым маркерам и маркерам дифференцировки с использованием методов проточной цитометрии и иммуноцитохимии. Исследовали возможность использования КГ в качестве скаффолда для 3D клеточного культивирования полученных клеток в целях создания эпидермального эквивалента кожи (ЭК).

Полученные результаты свидетельствуют, что эпидермис кожи является потенциальным источником эпидермальных СК. Выявлена высокая биосовместимость и принципиальная возможность применения КГ для 3D культивирования СК эпидермиса в целях создания ЭК. Дальнейшие исследования позволят разработать ЭК для оптимизации аутопластики перфорированным кожным лоскутом при лечении ожоговых ран или полноценной ее замене.

**А.Ю. Ефименко^{1,2}, Н.А. Басалова^{1,2}, А.Г. Сорокина¹,
Е.С. Новоселецкая^{1,2}, О.А. Григорьева¹,
Н.А. Александрюшкина^{1,2}, М.С. Арбатский²,
П.А. Тюрин-Кузьмин², К.Ю. Кулебякин^{1,2},
Н.И. Калинина², Я.А. Орлова¹, В.А. Ткачук^{1,2}**

**МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ
КАК РЕГУЛЯТОРЫ ПРОЦЕССОВ РЕПАРАЦИИ
И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ: ВКЛАД
НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В СЕКРЕТОМЕ
КЛЕТОК**

¹ Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**A.Yu. Efimenko^{1,2}, N.A. Basalova^{1,2}, A.G. Sorokina¹,
E.S. Novoseletskaia^{1,2}, O.A. Grigorieva¹,
N.A. Alexandrushkina^{1,2}, M.S. Arbatsky²,
P.A. Tyurin-Kuzmin², K.Yu. Kulebyakin^{1,2},
N.I. Kalinina², Ya.A. Orlova¹, V.A. Tkachuk^{1,2}**

**MESENCHYMAL STROMAL CELLS
AS REGULATORS OF TISSUE REPAIR AND
REGENERATION PROCESSES: IMPACT
OF NONCODING RNA IN CELL SECRETOME**

¹ Medical research and education center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of Fundamental medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

efimenkoan@gmail.com

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) считаются важнейшими участниками поддержания клеточного гомеостаза в организме и регуляторами сложного баланса между процессами репарации и регенерации тканей после повреждения. Показано, что в ответ на различные внешние сигналы эти клетки продуцируют широкий спектр биологически активных компонентов, включая секретируемые в составе внеклеточных везикул (ВВ) регуляторные некодирующие РНК, которые способны перепрограммировать микроокружение. Мы показали, что под влиянием процессов, происходящих в организме человека при старении и развитии хронических ишемических и метаболических заболеваний, в популяции МСК накапливаются клетки с признаками сенесцентных клеток, характеризующихся остановкой клеточного цикла, укорочением теломера, изменениями структуры хроматина, снижением эффективности системы репарации ДНК и специфическим секретомом, ассоциированным со старением (SASP), в качестве компонентов которого с недавнего времени активно изучают ВВ и их молекулярный состав. В этих условиях изменения секретомы МСК могут опосредовать нарушения их регуляторной функции при адаптивном ремоделировании поврежденных тканей. В наших исследованиях был показан вклад нкРНК (включая микроРНК-21 и -29с), переносимых в составе ВВ МСК, в способность этих клеток ингибировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты и тем самым регулировать развитие фиброза. Однако, мы обнаружили, что при старении профиль фиброз-ассоциированных микроРНК в ВВ МСК сдвигается в сторону профибротического, и антифибротические эффекты подавляются. С другой стороны, в ВВ этих клеток был выявлен ряд нкРНК (микроРНК-141, -302b, -148, -377), которые не детектируются в ВВ МСК молодых доноров и имеют общие мишени, включая некоторые транскрипционные факторы, регуляторы клеточного цикла и ингибитор PI3K/Akt/mTOR-сигнального пути (PTEN). Перенос комплекса таких нкРНК в клетки-реципиенты может вызывать их ускоренное старение и нарушение функциональной активности. Так, повышение содержания микроРНК-377 в ВВ сенесцентных МСК может опосредовать подавление индуцируемой адипогенной дифференцировки этих клеток, которое мы наблюдали для МСК, выделенных из тканей доноров старше 65 лет.

Таким образом, с учетом критической роли МСК в регуляции процессов репарации и регенерации тканей, специфические изменения их секретомы, включая профиль нкРНК, могут приводить к ухудшению регенераторного потенциала тканей и являться важной составляющей патогенеза многих заболеваний.

Работа по оценке накопления маркеров сенесцентных клеток в популяции МСК выполняется в рамках государственного задания МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, работа по изучению влияния ВВ МСК на дифференцировку фибробластов в миофибробласты была выполнена в рамках гранта РФФИ № 18-015-00525, работа по оценке функциональных свойств и секретомы МСК при старении поддержана грантом РФФИ № 19-29-04172.

Н.А. Жигалова, С.В. Женило

KAISO ЯВЛЯЕТСЯ МАРКЕРОМ ОТДЕЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОЖИ

Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

N.A. Zhigalova, S.V. Zhenilo

KAISO IS A MARKER FOR INDIVIDUAL SKIN STEM CELLS

Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

nzhigalova@gmail.com

Белок Kaiso является членом ВТВ/ПОЗ семейства метил-ДНК связывающих белков. Kaiso связывает метилированные CpG динуклеотиды за счет С-концевого домена «цинковые пальцы» С2Н2 типа. На N-конце белка находится ВТВ/ПОЗ домен, привлекающий крупные репрессивные комплексы к метилированной ДНК. Kaiso может являться как репрессором, так и активатором транскрипции генов, в зависимости от участка связывания и внешних воздействий [1]. Kaiso преимущественно экспрессируется в эпителиальных клетках различных органов и тканях, в нейронах и глии, является маркером отдельного вида сперматогониальных стволовых клеток. Данные по экспрессии белка Kaiso было получены методом иммуногистохимии [2, 3]. Цель данной работы заключалась в определении типа клеток у мыши, в которых экспрессируется Kaiso на основе анализа баз данных single-cell транскриптом (<https://tabula-muris.ds.czbiohub.org/>). В этой базе представлены данные для 53 760 клеток из 20 тканей, полученных из 8 мышей. Анализ уровня транскрипции Kaiso в различных органах подтвердил данные иммуногистохимии. Дополнительно мы нашли, что Kaiso экспрессируется в эпителиальных клетках сердца, легких, каналов поджелудочной железы, в клетках костного мозга. Высокий уровень Kaiso детектируется в гепатоцитах и beta панкреатических клетках, отвечающих за выработку инсулина. Экспрессия Kaiso характерна также для стволовых клеток и лейкоцитов кожи. Совместное иммуногистохимическое окрашивание на Kaiso и на CD34, который является поверхностным маркером стволовых клеток волосяных фолликулов, подтвердило, что Kaiso локализуется в некоторых стволовых клетках волосяного фолликула. Экспрессия Kaiso в стволовых клетках наблюдается и на стадии анагена, во время роста волосяного фолликула. Удаление гена Kaiso приводит к снижению пролиферативной активности клеток волосяного фолликула в процессе роста волос у мышей.

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта № 01201371085 и гранта РФФИ № 19-29-04139.

Литература:

- Zhenilo S, Deyev I, Litvinova E, Zhigalova N. et al. DeSUMOylation switches Kaiso from activator to repressor upon hyperosmotic stress. *Cell Death Differ.* 2018; 11: 1938–51.
- Zhigalova, N.A, Sokolov A.S., Prokhortchouk E.B., Zhenilo S.V. S100A3 is a new target gene of Kaiso in mouse skin. *Mol. Biol. (Mosk.)* 2015; 49: 362–65.
- Shumskaya V.S., Zhigalova N.A., Prokhortchouk A.V., Prokhortchouk E.B. Distribution of Kaiso protein in mouse tissues. *Histochem Cell Biol.* 2015; 143 (1): 29–43.

К.Э. Журенков^{1,2}, Б.Д. Бабков³,
М.С. Сердобинцев³, С.А. Александрова¹,
О.И. Александрова¹, М.И. Блинова¹

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОСТНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОСЛЕ ПЛАСТИКИ ДЕФЕКТА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ

¹ *Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский государственный университет, Россия*

³ *Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Россия*

K.E. Zhurenkov^{1,2}, B.D. Babkov³, M.S. Serdobintsev³,
S.A. Aleksandrova¹, O.I. Aleksandrova¹, M.I. Blinova¹

MORPHOLOGICAL ASPECTS OF BONE REGENERATION AFTER TISSUE-ENGINEERED GRAFTING

¹ *Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia*

² *Saint Petersburg State University, Russia*

³ *Saint Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology MH RF, Russia*

kirill.zhurenkov.97@mail.ru

Актуальность исследования продиктована необходимостью использования принципиально нового остеозамещающего материала для пластики операционных дефектов в хирургии костного туберкулеза. Опыт по использованию в СПб НИИФ МЗ РФ ряда коммерческих остеозамещающих материалов для пластики дефектов кости выявил необходимость дополнительной стимуляции регенерации костной ткани при лечении туберкулезных оститов [1]. Нами разработана тканеинженерная конструкция (ТК) эквивалента костной ткани, состоящая из мезенхимных стволовых клеток (МСК) красного костного мозга (ККМ), коллагенового геля и стеклокристаллического материала «Биосит Ср-Элкор» (Россия) (биоситалл) [2].

Цель исследования — установить наличие жизнеспособных МСК в составе ТК, имплантированной в искусственный дефект метафиза бедренной кости кроликов.

Первичную культуру МСК ККМ кролика получали из костей задней конечности кролика породы Шиншилла. Суспензию клеток, предварительно окрашенных прижизненным флуоресцентным красителем PKH26, помещали в коллагеновый гель (2 мг/мл) вместе с гранулами биоситалла (0,1–0,3 мм).

Разработанные ТК применяли для восстановления смоделированного дефекта в метаэпифизарной области бедренной кости кроликов. Через 1, 2 и 4 мес кроликов выводили из эксперимента, производили забор материала костной ткани, располагающейся на месте дефекта, и изготавливали гистологические (криостатные) срезы. Наличие клеток определяли методом конфокальной микроскопии при длине волны 560 нм.

Результаты гистологического исследования показали, что к 30 сут эксперимента дефект в метаэпифизарной области бедренной кости с имплантированным материалом заполняется хорошо оформленными костными трабекулами. Заживление дефекта происходит по механизму регенерации пластинчатой костной ткани. На препаратах встречаются группы окрашенных PKH26 клеток. Флуоресцентно-меченые клетки выявляются как на ранних сроках, так и спустя 4 мес после имплантации, однако количество их уменьшается.

Можно заключить, что выполненное исследование выявило наличие жизнеспособных имплантированных МСК в месте дефекта в течение длительного периода времени, что подтверждает их участие в процессе регенерации.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-29-04082 и государственного задания № 0124-2019-0003 при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Литература:

1. Сердобинцев М.С., Кафтырев А.С., Бердес А.И., Луцкая О.Л. Пластика дефектов кости остеозамещающими материалами в хирургии туберкулезного коксита (клинико-экспериментальное исследование). Медицинский альянс. 2014; (1):31–36.
2. Касьянова Е.С., Копелев П.В., Александрова С.А. Оценка влияния модификации коллагеном I типа поверхности остеозамещающего материала «Биосит-Ср Элкор» на жизнеспособность мезенхимных стромальных клеток костного мозга. Бюллетень инновационных технологий. 2018; 2(3):33–37.

**И.В. Зубарев^{1,2}, С.А. Синенко¹, С.В. Пономарцев¹,
У.И. Поденкова^{1,2}, А.Р. Газизова¹,
А.Н. Томилин^{1,2}, А.С. Цимоха¹, Т.И. Зюбко¹**

УЧАСТИЕ ИММУНОПРОТЕАСОМ В ПРОЦЕССЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ МЫШИНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТЕВЛОВЫЕ КЛЕТКИ

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

**I.V. Zubarev^{1,2}, S.A. Sinenko¹, S.V. Ponomartsev¹,
U.I. Podenkova^{1,2}, A.R. Gazizova¹,
A.N. Tomilin^{1,2}, A.S. Tsimokha¹, T.I. Zyubko¹**

PARTICIPATION OF IMMUNOPROTEASOME IN THE PROCESS OF GENETIC REPROGRAMMING OF MOUSE EMBRYONIC FIBROBLASTS INTO INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

ZubarevIvanV@yandex.ru

Одним из основных подходов для лечения тяжелых заболеваний человека является заместительная терапия, основанная на применении плюрипотентных стволовых клеток (ПСК). Получение индуцированных ПСК (иПСК) в ходе генетического репрограммирования чревато возникновением генетических и эпигенетических ошибок с последующим злокачественным преобразованием этих клеток. Понимание молекулярных механизмов, задействованных в процессах клеточного репрограммирования, позволит управлять процессами получения иПСК, исключая вероятность образования опухолей. Поддержание белкового гомеостаза играет одну из ведущих ролей в этих клетках, основным способом поддержания которого является работа убиквитин-протеасомной системы. Протеасома состоит из коровой 20S и одной или двух регуляторных 19S частиц. Существует также дополнительный регулятор активности PA28. При определенных условиях конститутивные каталитические субъединицы 20S коровой частицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ могут замещаться на индуцибельные субъединицы — $\beta 1i/LMP2$, $\beta 2i/MECL1$ и $\beta 5i/LMP7$, формируя иммунопротеасому (ИП). Последние данные показывают,

что ИП участвуют в поддержании плюрипотентности клеток и в дифференцировке, однако, их роль в этих процессах не ясна. В связи с этим, целью нашей работы стало изучение роли ИП в индукции клеточной плюрипотентности. В процессе соматического репрограммирования мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФ) с помощью форсированной экспрессии ключевых транскрипционных факторов Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Myc мы показали изменение экспрессии субъединиц ИП $\beta 5i/LMP7$ и PA28 α частицы, что указывает на возможное участие ИП в процессе репрограммирования. Чтобы выяснить функциональную роль протеасомной системы в процессе репрограммирования, мы использовали ингибитор широкого спектра, блокирующий активности $\beta 5$ и $\beta 5i/LMP7$, и селективный ингибитор для $\beta 5i/LMP7$. Ингибирование активности протеасом с помощью обоих ингибиторов приводило к резкому снижению эффективности генерации иПСК из МЭФ, что свидетельствует о важности ИП в генерации иПСК. Для выяснения роли ИП в генерации иПСК мы использовали генетическое нокаутирование. В нашей работе были использованы МЭФ, дефицитные по иммуносубъединицам $\beta 5i/LMP7$, $\beta 2i/MECL1$, а также по обеим субъединицам регулятора PA28 α/β . Таким образом, нокаут по $\beta 5i/LMP7$ и $\beta 2i/MECL1$ приводил к выключению активности различных типов ИП. Мы показали, что МЭФ, дефицитные как по иммуносубъединицам $\beta 5i/LMP7$, $\beta 2i/MECL1$, так и по регуляторной частице PA28 α/β , имеют существенно сниженную способность к репрограммированию в иПСК. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что работа ИП в комплексе с регулятором PA28 α/β является исключительно важной при получении иПСК мыши.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (19-29-04117).

**Ю.С. Иванова, О.Г. Люблинская, Н.А. Пуговкина,
И.Э. Неганова, Н.Н. Никольский**

БИОСЕНСОР ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА HYPER КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССА КЛЕТОЧНОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ В ПЛЮРИПОТЕНТНОЕ СОСТОЯНИЕ

Институт цитологии Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

**Ju.S. Ivanova, O.G. Lyublinskaya, N.A. Pugovkina,
I.E. Neganova, N.N. Nikolsky**

HYDROGEN PEROXIDE BIOSENSOR HYPER AS A TOOL FOR STUDYING REDOX REGULATION OF CELL REPROGRAMMING TO PLURIPOTENCY

Institute of Cytology of the Russian Academy of Science,
Saint Petersburg, Russia

ju.s.ivanova@yandex.ru

Развитие техники репрограммирования клеток в плюрипотентное состояние открывает большие перспективы для персонализированной регенеративной медицины. В настоящий момент главными недостатками данной технологии являются длительность и низкая эффективность процесса, что свидетельствует о наличии молекулярных барьеров репрограммирования, изучение способов более эффективного преодоления которых активно ведется в настоящее время. Известно, что сигнальные пути, контролируемые метаболические сдвиги, происходящие

в процессе де-дифференцировки, такие как переход от окислительного фосфорилирования к гликолизу, являются редокс-зависимыми [1]. Перекись водорода обычно рассматривается как центральная сигнальная молекула, участвующая в различных окислительно-восстановительных процессах. Однако существующие данные, связанные с ее ролью в репрограммировании, часто противоречивы, в основном из-за неспецифичности красителей, рутинно используемых для детекции H₂O₂. В связи с этим, в качестве альтернативного подхода, мы предлагаем использовать генетически-кодируемый биосенсор HyPer, который позволяет измерять внутриклеточную концентрацию перекиси водорода в живых клетках с высокой степенью специфичности и чувствительности. В данной работе, нами была впервые получена линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из линии взрослых клеток человека, экспрессирующих биосенсор HyPer. ИПСК, полученные посредством лентивирусной трансдукции факторов Яманака, имеют типичную морфологию, экспрессируют необходимые поверхностные маркеры, а также биосенсор H₂O₂. Данный подход позволил нам провести предварительные измерения динамики уровня H₂O₂ в различных клеточных популяциях на разных этапах клеточного репрограммирования. Используя недавно разработанную в нашей лаборатории [2] методику анализа флуоресценции HyPer с помощью проточной цитометрии, мы показали модуляцию этого уровня в процессе де-дифференцировки. Таким образом, разработанный подход имеет большой потенциал для изучения окислительно-восстановительной регуляции индукции плюрипотентности.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-34-90176.

Литература:

1. Hawkins, K. E. *et al.* NRF2 Orchestrates the Metabolic Shift during Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming. *Cell Rep.* 14, 1883–91 (2016).
2. Lyublinskaya, O. G. *et al.* Flow cytometric HyPer-based assay for hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* (2018). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.091

И.Р. Ишмухаметов, Ф.С. Ахатова, Э.В. Рожина,
Р.Н. Мингалева, Р.Ф. Фахруллин

РАЗРАБОТКА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОДЛОЖЕК ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ АДИПОГЕНЕЗА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

I.R. Ishmukhametov, F.S. Akhatova, E.V. Rozhina,
R.N. Mingaleeva, R.F. Fakhrullin

DEVELOPMENT OF MODIFIED SUBSTRATES FOR ENHANCED ADIPOGENESIS OF MESENCHYMAL STEM CELLS

Kazan Federal University, Kazan, Russia

irishmukhametov@gmail.com

Для дифференцировки стволовых клеток необходимо наличие в питательной среде определенных сигнальных молекул и длительное время культивации. Вместе с тем, сильное влияние оказывают межклеточные взаимодействия и внеклеточный матрикс. Поэтому поиск и исследование материалов, стимулирующих адгезию, пролиферацию

и дифференцировку клеток является важной задачей тканевой инженерии. Одним из перспективных материалов являются магнитные наночастицы оксида железа (МНЧ): биосовместимость и восприимчивость ко внешнему магнитному полю позволяют использовать их для создания субстрата с комплексной нанотопографией.

Целью работы являлась разработка биосовместимых подложек, модифицированных магнитными наночастицами для дифференцировки стволовых клеток. МНЧ были синтезированы методом химического осаждения солей железа. Модификация подложек выполнена посредством высушивания коллоидного раствора частиц в количестве 300 и 600 мкг на образец с последующей самосборкой МНЧ на поверхности стекла. Анализ морфологии и шероховатости образцов проведен с помощью атомно-силовой микроскопии. Дифференцировка иммортализованных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК) в адипоциты проводилась с использованием питательной среды DMEM/F12, содержащей индометацин, дексаметазон, инсулин и 3-изобутил-1-метилксантин. На 21 день культивации липидные капли адипоцитов были окрашены масляным красным O. По результатам исследования средняя шероховатость образцов с 300 и 600 мкг МНЧ составила 46±8,3 нм и 54,8±12,2 нм, соответственно. При этом увеличение количества частиц в 2 раза приводило к образованию трещин на поверхности субстрата и снижению стабильности покрытия. Показано, что культивация клеток на образце с 300 мкг МНЧ не препятствует дифференцировке в адипоциты. Полученные данные позволяют рассматривать подложки на основе магнитных наночастиц в качестве биосовместимого клеточного субстрата в дальнейших исследованиях по направленной дифференцировке клеток.

Работа выполнена в рамках государственной поддержки КФУ в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров и при поддержке правительства республики Татарстан и РФФИ в рамках научного проекта № 18-44-160001 и проекта РФФИ № 18-29-25057.

А.В. Комова, К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева,
Ю.Д. Василец, Е.С. Зубкова, И.Б. Белоглазова,
Е.И. Ратнер, Е.В. Парфенова

ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ФАКТОР РОСТА (PDGF-BB) РЕГУЛИРУЕТ ПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ И МИГРАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ЭПИКАРДА МЫШИ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

A.V. Komova, K.V. Dergilev, Z.I. Tsokolaeva,
Yu.D. Vasilets, E.S. Zubkova, I.B. Beloglazova,
E.I. Ratner, Ye.V. Parfenova

PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR (PDGF-BB) REGULATES PROLIFERATIVE AND MIGRATION PROPERTIES OF MICE EPICARDIAL CELLS

National Medical Research Center of Cardiology,
Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow,
Russia

komova1305@yandex.ru

В последние годы внимание исследователей привлечено к изучению эпикарда, который представляет собой

мембраноподобный слой, покрывающий сердце снаружи, и представленный гетерогенной популяцией клеток. В период эмбрионального развития клетки эпикарда вступают в эпителиально-мезенхимальный переход, что приводит к образованию клеток-предшественниц для построения коронарных сосудов, сердечных клапанов и соединительно-тканного каркаса сердца. Оказалось, что в постнатальном сердце клетки эпикарда сохраняют способность к реактивации (после инфаркта миокарда), которая сопровождается их пролиферацией, миграцией в нижележащие слои сердечной стенки и дифференцировкой, которые являются ключевыми этапами эпикардального репаративного ответа. Однако механизмы, запускающие вышеуказанные процессы остаются малоизученными.

Цель исследования: изучить влияние рекомбинантного PDGF-bb на пролиферативные и миграционные свойства клеток эпикарда мыши.

Для получения клеток эпикарда использован протокол ферментативной обработки с последующим механическим удалением эпикардального слоя клеток с поверхности сердца мыши (C57Bl6). Исследование пролиферативных свойств проведено с помощью МТТ-теста, миграционных — Scratch assay. Маркеры эпикардальных, гладкомышечных клеток и фибробластов исследовали с помощью иммуоцитохимии.

Выделенные клетки эпикарда имели «cobblestone» морфологию, образовывали плотные контакты и характеризовались экспрессией транскрипционного фактора WT1. При культивировании клеток в среде, содержащей рекомбинантный фактор PDGF-bb, наблюдалось формирование мезенхимоподобного фенотипа, реорганизации цитоскелета, уменьшение экспрессии маркера WT1 и появление маркеров фибробластов и гладкомышечных клеток. Показано, что воздействие рекомбинантного фактора роста PDGF-bb оказывает стимулирующее воздействие на пролиферативные и миграционные свойства клеток эпикарда.

Таким образом, воздействие рекомбинантного фактора роста PDGF-bb способствовало приобретению клетками эпикарда мезенхимоподобного фенотипа, появлению маркеров гладкомышечных клеток и фибробластов, а также стимуляции их пролиферативной и миграционной активности. Следовательно, PDGF-bb может рассматриваться в качестве возможного инструмента таргетного воздействия на пул прогениторных клеток эпикарда.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 19-29-04164 и № 18-015-00438.

**Н.С. Кулишкин, Г.П. Маслаков,
А.А. Суркова, М.А. Кулакова**

ЗАЧЕМ ООЦИТАМ ТРАНСКРИПТЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫХ ГЕНОВ?

Санкт-Петербургский государственный университет

**N.S. Kulishkin, G.P. Maslakov,
A.A. Surkova, M.A. Kulakova**

WHY DO OOCYTES NEED TRANSCRIPTS OF DIFFERENTIATION GENES?

Saint Petersburg State University

incertaesedis@protonmail.com

В исследованиях, нацеленных на изучение доли генома, которая участвует в развитии, было показано,

что большая часть генетической информации у многоклеточных животных реализуется в оогенезе и раннем эмбриогенезе [1]. В этот период геном билатеральных животных транскрибируется чуть менее, чем полностью. Среди материнских транскриптов млекопитающих обнаруживаются иРНК генов, которые контролируют развитие, в том числе матрицы эволюционно-консервативных генов из класса ANTP (Hox- и ParaHox-гены) [2]. Парадокс заключается в том, что на уровне зиготического генома Hox-гены активируются поздно. Их транскрипция в эмбриональных стволовых клетках «поставлена на паузу» за счёт амбивалентных эпигенетических меток на хроматине Hox-локусов [3]. Поскольку Hox-гены управляют дифференцировкой клеток и спецификацией клеточных территорий вдоль основной оси тела, их активация несовместима с тотипотентным и плюрипотентным состоянием. Ранняя функция этих генов в ооцитах и дробящихся эмбрионах должна сильно отличаться от поздней. У млекопитающих найдены материнские иРНК нескольких Hox-генов и, по меньшей мере, один материнский Hox-белок (HoxB9) [4]. Белок HoxB9 имеет сложный динамический паттерн в экстраэмбриональных тканях и можно предположить, что Hox-гены млекопитающих кооптированы в программу до-гастрюляционного этапа развития. Мы исследуем работу генов Hox-кластера у морской аннелиды *Platynereis dumerilii*. Методом RT-PCR на кДНК, полученной из неоплодотворённых ооцитов, мы обнаружили материнские РНК всех Hox-генов червя. В одном из экспериментов мы использовали для реверсии прямые и обратные геноспецифичные праймеры к последовательности *PduHox4* и выявили как смысловой, так и антисмысловой транскрипты. Мы предполагаем, что ранняя криптическая функция Hox-генов может быть связана с настройкой работы зиготического генома и не ограничивается эмбриогенезом млекопитающих. Значительный эволюционный возраст этого феномена переносит фокус загадки на билатеральных животных в целом.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-04-00450 А.

Литература:

1. Davidson E.H. et al. Activation of sea urchin actin genes during embryogenesis. Measurement of transcript accumulation from five different genes in *Strongylocentrotus purpuratus*. *J Mol Biol.* 1986 Mar 20;188(2):173–83.
2. Paul Det.al.HOXgenes are expressed in bovine and mouse oocytes and early embryos. *Mol Reprod Dev.* 2011 Jun;78(6):436–49. doi: 10.1002/mrd.21321. Epub 2011 May 12.
3. Sachs M et al. Bivalent chromatin marks developmental regulatory genes in the mouse embryonic germline in vivo. *Cell Rep.* 2013 Jun 27;3(6):1777–84. doi: 10.1016/j.celrep.2013.04.032. Epub 2013 May 30.
4. Sauvegarde C et al. Dynamic Pattern of HOXB9 Protein Localization during Oocyte Maturation and Early Embryonic Development in Mammals. *PLoS One.* 2016 Oct 31;11(10):e0165898. doi: 10.1371/journal.pone.0165898. eCollection 2016.

П.И. Макаревич^{1,2}, Р.Ю. Еремичев¹,
Н.А. Александрович^{1,2}, П.П. Нимирицкий^{1,2},
М.С. Арбатский², А.Ю. Ефименко^{1,2}, В.А. Ткачук^{1,2}

РОЛЬ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В КООРДИНАЦИИ ПОСТНАТАЛЬНОГО МОРФОГЕНЕЗА

¹ *Институт регенеративной медицины МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

² *Факультет фундаментальной медицины МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

P.I. Makarevich^{1,2}, R.Yu. Eremichev¹,
N.A. Alexandrushkina^{1,2}, P.P. Nimiritsky^{1,2},
M.S. Arbatskiy², A.Yu. Efimenko^{1,2}, V.A. Tkachuk^{1,2}

ROLE OF STROMAL CELLS IN COORDINATION OF POSTNATAL MORPHOGENESIS

¹ *Institute for regenerative medicine, Lomonosov
Moscow State University Moscow, Russia*

² *Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov
Moscow State University Moscow, Russia*

pmakarevich@mc.msu.ru

Среди разнообразия резидентных клеток ведущую роль в регуляции тканевого гомеостаза и ответе на повреждение играют клетки стромы мезенхимного происхождения (МСК), обнаруженные практически во всех тканях организма.

В настоящее время наша работа сконцентрирована на изучении координирующей тканеспецифичной роли стромальных клеток в регенерации тканей человека. Особенно важным нам представляется расшифровка механизмов регуляции баланса двух ключевых морфогенных процессов — фиброза и регенерации. В ходе работы нами были исследованы тканеспецифичные свойства МСК из тканей, склонных к фиброзированию (кожа, жировая ткань) и к регенерации (эндометрий, костный мозг) после повреждения. В рамках данной работы мы изучали не только влияние МСК на ангиогенез в моделях сокультивирования с клетками эндотелия, сборку тканеинженерных конструкций в виде пластов, но также оценивали роль окружения, сопровождающего ранозаживление, в активации фиброза или регенерации. Для этого нами были использованы препараты растворимых факторов, выделенных из сыворотки периферической крови и менструальной жидкости.

При анализе данных РНК-секвенирования показаны свойства МСК, отражающие их потенциальную роль как «координаторов» формирования тканеподобных структур, в т.ч. после повреждения органов. Было показано, что стромальные клетки способны к самоорганизации и формированию гетерогенных конструкций, а также была дана их характеристика в плане стабилизации и поддержания клеток эндотелия. Нами был изучен ответ МСК из различных источников к фиброгенным стимулам (TGF- β 1) и их дифференцировочный потенциал, что позволило выявить уникальные МСК эндометрия свойства по сравнению с клетками из других источников.

Представленная работа предлагает рассматривать функцию МСК как «клеток-координаторов», активация которых при повреждении приводит к запуску тканеспецифичной программы. Успешная реализации это программы может зависеть от растворимых факторов, содержащихся в окружении, сопровождающем восстановление ткани.

Работа была выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова и поддержана

грантами Президента РФ № МК-1068.2019.7 (выделение стромальных клеток), Российского фонда фундаментальных исследований № 18-315-20053 (вестерн-блоттинг и протеомные работы) и Российского научного фонда № 19-75-00067 (сокультивирование с клетками эндотелия, иммуноцитохимические опыты). В ходе работы использовано оборудование, закупленное в рамках Программы развития МГУ, а также биоматериал человека из коллекции МГУ, сформированной в рамках проекта РНФ «Ноев ковчег».

Д.К. Матвеева, Е.Р. Андреева

РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МАТРИКСОВ ОТ МСК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРИ РАЗЛИЧНОМ УРОВНЕ O₂

*Институт медико-биологических проблем РАН,
Москва, Россия*

D.K. Matveeva, E.R. Andreeva

RECELLULARIZATION OF EXTRACELLULAR MATRIX FROM MSCS CULTURED AT DIFFERENT O₂ LEVELS

Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow, Russia

matveeva.dajana@yandex.ru

Децеллюляризованный внеклеточный матрикс (дцВКМ) имеет преимущество перед отдельными компонентами ВКМ, поскольку сохраняет структуру и биохимические свойства. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) продуцируют молекулы ВКМ, а также remodelируют его в зависимости от условий микроокружения, в частности, уровня O₂. Целью нашего исследования было охарактеризовать эффективность адгезии и морфологию МСК на дцВКМ от МСК, культивированных при различном уровне O₂.

Препараты дцВКМ были получены от МСК из жировой ткани человека, постоянно культивируемых при 20% O₂ (20-дцВКМ) или 5% O₂ (5-дцВКМ). Для децеллюляризации использовали 0,5% Triton X-100/20 mM NH₄OH. Далее МСК высевали на 20- или 5-дцВКМ и коллаген типа I (Coll) и культивировали при 20% O₂. После 40 минут инкубации в прикрепившихся МСК выявляли актиновый цитоскелет с помощью Alexa488-меченого фаллоидина.

При анализе эффективности адгезии было показано, что больше всего прикрепившихся МСК было на 5-дцВКМ. Мы выделили 5 типов распластывания МСК согласно [1]: 1 тип — дисковидной формы, 2 тип — с широкой ламеллой на ведущем крае, 3 тип — сильно распластаные с множественными ламеллами, 4 тип — неправильной формы с изрезанным краем, 5 тип — мелкие с неопределенной морфологией. На Coll по сравнению с дцВКМ отсутствовали клетки типа 3 и была увеличена доля МСК 1 и 2 типов, в 1,5 и 2 раза, соответственно. На 5-дцВКМ по сравнению с 20-дцВКМ был выше процент МСК типов 3 и 4, образование которых происходит на мягких субстратах, и ниже — типа 5. В МСК на дцВКМ структуры F-актина были расположены в центре клеток и на концах псевдоподий, тогда как на Coll клетки имели типичную для жестких субстратов структуру F-актина в виде стресс-фибрилл.

Таким образом, физические и топографические свойства дцВКМ от МСК обеспечивают быстрое прикрепление и распластывание, сокращая время пребывания в дисковидной форме, характерной для клеток на более жестких подложках, таких как Coll. При этом

эффективность адгезии максимальна на дцВКМ от МСК при «физиологической» гипоксии.

Формирование ВКМ *in vitro* с определенными свойствами за счет использования факторов микроокружения, таких как уровень O_2 , представляет интерес для изучения влияния ВКМ на функциональную активность МСК и в связи с возможностью использования дцВКМ для получения биосовместимых покрытий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы Президиума РАН № 19.

Литература:

1. Александрова С.А., Пинаев Г.П. (2014). Биофизика, 59 (5), 913–918.

А.О. Монакова¹, Н.А. Басалова^{1,2}, М.В. Балабан², Г.Д. Сагарадзе², В.С. Попов¹, А.Ю. Ефименко^{1,2}

УСТАНОВЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НИШИ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНОЙ СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ С ПОМОЩЬЮ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

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

² Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

A.O. Monakova¹, N.A. Basalova^{1,2}, M.V. Balaban², G.D. Sagaradze¹, V.S. Popov¹, A.Yu. Efimenko^{1,2}

DETERMINATION OF MESENCHYMAL STROMAL CELL SECRETOME-DRIVEN MECHANISMS OF THE SPERMATOGONIAL STEM CELL NICHE RECOVERY

¹ Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

monakova-anya@mail.ru

Постнатальные стволовые клетки вкупе со своим специфическим микроокружением, нишей стволовой клетки, нужны для поддержания гомеостаза и регенерации ткани. Поведение стволовых клеток регулируется компонентами ниши, поэтому повреждение или нарушение их функции может приводить к утрате целостности и работоспособности ткани. Поэтому для восстановления ткани ниша должна быть способна восстанавливать собственную структуру и функцию. Однако, механизмы восстановления ниши стволовой клетки до настоящего момента остаются практически не изученными. Ключевыми участниками этого процесса могут являться мезенхимные стромальные клетки (МСК), которые способны стимулировать пролиферацию, дифференцировку резидентных клеток, обеспечивать их жизнеспособность за счет секреции трофических факторов, а также поддержания ангиогенеза и нейрогенеза. Однако, могут ли МСК управлять регенерацией ниши, действуя непосредственно на ее компоненты, остается неизвестным. Для исследования роли МСК в этом процессе была выбрана ниша сперматогонимальной стволовой клетки (ССК), так как ее морфология, а также сигнализация между отдельными

компонентами ниши хорошо изучены. На модели двухстороннего абдоминального крипторхизма у крыс в нашей лаборатории было показано, что МСК и их секретом могут участвовать в восстановлении функции поврежденной ниши ССК. Мы предположили, что регенераторные эффекты секрета МСК реализуются преимущественно на уровне поддерживающих клеток ниши ССК: клеток Лейдига и/или клеток Сертоли. Для проверки гипотезы из семенников крысы были выделены культуры клеток Лейдига, клеток Сертоли и ССК. В результате было установлено, что воздействие секрета МСК на клетки Лейдига усиливало миграцию клеток Сертоли, стимулированную этими клетками. При этом, добавление секрета МСК не влияло на секрецию тестостерона клетками Лейдига, а также на секрецию глиального нейротрофического фактора клетками Сертоли. Было также обнаружено, что секретом МСК поддерживал жизнеспособность колоний ССК длительное время. Таким образом, можно предполагать, что в нише основной мишенью секрета МСК являются клетки Лейдига. При этом, секретом МСК может поддерживать жизнеспособность ССК в отсутствие поддерживающих компонентов ниши. Однако, для окончательного установления механизмов действия секрета МСК в нише ССК требуются дальнейшие исследования.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 19-75-30007, выделение и культивирование МСК, клеток семенников, получение секрета МСК), РФФИ (№ 18-315-00403, реактивы для молекулярно-биологических исследований) и в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова с использованием оборудования, закупленного по Программе развития МГУ (цитологические исследования).

Ю.П. Новикова, Э.Н. Григорян
РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА В УСЛОВИЯХ ОРГАНОТИПИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO И ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ СЕТЧАТКИ IN VIVO У НИЗШИХ И ВЫСШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

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

Yu. Novikova, E. Grigoryan
RETINAL REMODELING UNDER CONDITIONS OF ORGANOTYPIC 3D CULTURING IN VITRO AND RETINAL DAMAGE IN VIVO IN VERTEBRATES

Koltzov Institute of Developmental Biology, RAS, Moscow, Russia

novikovayulia@gmail.com

Ремоделирование сетчатки (РС) — явление, представляющее собой одно из последствий патологических изменений, вызванных повреждением популяций нейронов сетчатки вследствие заболевания или травмы. Мы исследовали РС на моделях у низших и высших животных, для понимания основных закономерностей явления. РС у амфибий (взрослых тритонов *Pt. waltl.*) изучали в условиях *in vivo* и *in vitro* после облучения сетчатки глаза ярким светом, отслойки сетчатки и ее тканевого культивирования. Были выявлены регенераторные ответы со стороны трех клеточных популяций: ретиального пигментного

эпителия (РПЭ), биполярно-подобных клеток внутреннего ядерного слоя и глиальных клеток Мюллера. Первые мигрировали вовнутрь в толщу сетчатки, делились и затем встраивались в структуру сетчатки, замещая погибшие нейроны. Вторые смещались в наружный ядерный слой и, дифференцируясь, восполняли утерю фоторецепторов. Третьи — макроглиальные клетки — демонстрировали гипертрофию и пролиферацию. В условиях тканевого 3D культивирования, сетчатка тритона обнаруживала способность реконструирования с участием тех же клеток, а также клеток ростовой зоны сетчатки. Таким образом, РС у тритона основана на ее регенерации, сохраняющей жизнеспособность и функцию.

РС у высших позвоночных *in vivo* изучали на модели индуцированной ярким светом дегенерации сетчатки у взрослых крыс *Wistar*. Здесь РС проявлялось в виде вымещения, трансформации в макрофагальный фенотип клеток РПЭ, топологической транслокации биполяров и амакриновых клеток на место «выбитых» светом фоторецепторов, а также глиального ответа. Клеточные механизмы для РС у крысы оказались сходными с таковыми у тритона, но из-за невозможности репрограммирования клеток сетчатки крысы в нейральном направлении не приводили к клеточному замещению и сохраняли только целостность структуры сетчатки. Результаты экспериментов в условиях культивирования «whole amount» сетчатки крысы подтвердили данные, полученные на модели облучения светом. Таким образом, исследованные нами клеточные механизмы РС у разных животных свидетельствуют о возможности в условиях патологии и клеточной гибели поддерживать структуру этого наиважнейшего сенсорного органа за счет сходных клеточных популяций, однако регенерация сетчатки остается прерогативой амфибий, но не млекопитающих.

Е.С. Новоселецкая^{1,2}, Г.Д. Сагарадзе¹,
Н.А. Басалова^{1,2}, О.А. Григорьева¹,
А.Ю. Ефименко^{1,2}

**ПОДДЕРЖАНИЕ ФЕНОТИПА СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
НА ВНЕКЛЕТОЧНОМ МАТРИКСЕ,
ПРОДУЦИРУЕМОМ МЕЗЕНХИМНЫМИ
СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ**

¹ Институт регенеративной медицины, МНОЦ, МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E.S. Novoseleetskaya^{1,2}, G.D. Sagaradze¹,
N.A. Basalova^{1,2}, O.A. Grigorieva¹, A.Yu. Efimenko^{1,2}

**EXTRACELLULAR MATRIX PRODUCED
BY MESENCHYMAL STROMAL CELLS
PROVIDE MAINTENANCE OF THE STEM CELL
PHENOTYPE**

¹ Institute for regenerative medicine, Medical research
and education center, Lomonosov Moscow State
University, Moscow, Russia

² Faculty of Fundamental medicine, Lomonosov
Moscow State University, Moscow, Russia

novoseleetskaya.es@gmail.com

Фенотип каждой клетки тесно взаимосвязан с ее микроокружением, которое включает специфический внеклеточный матрикс (ВКМ), растворимые факторы,

а также межклеточные контакты. Особенно важным для нормального функционирования тканей и органов и, как следствие, для продолжительного существования целого организма принято считать поддержание пула стволовых клеток. Поэтому воссоздание микроокружения стволовых клеток *in vitro* для исследования их взаимодействия друг с другом является важной задачей регенеративной медицины. Одним из перспективных подходов для решения данной задачи является использование специфических компонентов ВКМ для культивирования стволовых клеток. Мезенхимные стромальные клетки, являясь важным участником формирования микроокружения резидентных стволовых клеток, активно продуцируют ВКМ. Поэтому мы исследовали стабильность фенотипа МСК и ССК при культивировании на ВКМ, продуцируемом МСК.

ВКМ был выделен из клеточных пластов иммортализованных МСК согласно ранее разработанному протоколу децеллюляризации с помощью детергента CHAPS и обработки ДНКазой I типа. В качестве контроля использовали культуральный пластик, а также рекомбинантный человеческий фибронектин. В данной работе были использованы первично выделенные МСК жировой ткани человека, а также сперматогониальные стволовые клетки (ССК) крысы линии *Wistar*. В течение двух недель проводили культивирование стволовых клеток на покрытиях и оценивали изменение уровня экспрессии *Nanog*, *Oct4*, *Sox2* для МСК, а также специфических маркеров *GDNFR*, *c-kit* и *HSP2A* для ССК. Кроме того, была оценена способность клеток к дифференцировке в канонические направления для МСК.

Полученные данные показали, что ВКМ обеспечивает успешное выделение и поддержание жизнеспособности МСК и ССК. Важно подчеркнуть, что при культивировании на полученном ВКМ образуются колонии МСК большего диаметра по сравнению с пластиком, а также увеличивается экспрессия генов плюрипотентности в МСК. МСК, культивированные на ВКМ, быстрее дифференцируются в адипогенном и остеогенном направлениях в индукционных условиях. Также было установлено, что ВКМ от МСК способен поддерживать не только пролиферацию и стволовость ССК, но и развитие их дифферона.

Таким образом, результаты нашего исследования демонстрируют существенный вклад ВКМ, продуцированного МСК, в формирование поддерживающего микроокружения стволовых клеток. Результаты исследования в перспективе могут лечь в основу создания новых бесклеточных продуктов для регенеративной медицины.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-29-04172, работа по изучению поддержания тканеспецифичных стволовых клеток на примере сперматогенных стволовых клеток; грант № 19-315-90060, работа по получению ВКМ, а также оценке экспрессии маркеров дифференцировки и плюрипотентности в МСК на разных сроках культивирования клеток в присутствии стандартных и дифференцировочных культуральных сред).

Литература:

1. Kuznetsova E.S., Nimiritsky P.P., Grigorieva O.A. et al. Decellularized extracellular matrix of human mesenchymal stromal cells as a novel biomaterial for regenerative medicine. *Human Gene Therapy* 2018; 29(12): pp. A75–A76.

Е.С. Новоселецкая^{1,2}, О.А. Григорьева¹,
И.Г. Миловская³, К.Ю. Кулебякин^{1,2},
М.А. Кулебякина¹, П.П. Нимирицкий^{1,2},
П.И. Макаревич^{1,2}, В.А. Ткачук^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{1,2}

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
КОМПОНЕНТАМИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО
МАТРИКСА, ПРОДУЦИРУЕМОГО
МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ
КЛЕТКАМИ**

¹ Институт регенеративной медицины, МНОЦ, МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Биологический факультет, МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E.S. Novoseletskaia^{1,2}, O.A. Grigorieva¹,
I.G. Milovskaya³, K.Yu. Kulebyakin^{1,2},
M.A. Kulebyakina¹, P.P. Nimiritskiy^{1,2},
P.I. Makarevich^{1,2}, V.A. Tkachuk^{1,2}, A.Yu. Efimenko^{1,2}

**MECHANISMS OF REGULATION OF STEM CELL
DIFFERENTIATION BY THE MESENCHYMAL
STROMAL CELL-PRODUCED EXTRACELLULAR
MATRIX COMPONENTS**

¹ Institute for regenerative medicine, Medical research
and education center, Lomonosov Moscow State
University, Moscow, Russia

² Faculty of Fundamental medicine, Lomonosov
Moscow State University, Moscow, Russia

³ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State
University, Moscow, Russia

novoseletskaia.es@gmail.com

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются важнейшими участниками процессов обновления и восстановления тканей за счет секреции широкого спектра биологически активных веществ, включая компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ), которые обеспечивают поддержание и тонкую регуляцию ниш тканеспецифичных стволовых клеток. Изменения функциональной активности МСК в значительной степени зависят от сигналов микроокружения клеток, в том числе от ВКМ. В нашей работе мы выясняли механизмы влияния ВКМ, продуцируемого МСК, на поддержание и дифференцировку стволовых клеток, содержащихся в популяции МСК.

Приближенный к нативному ВКМ был получен с помощью децеллюляризации (дВКМ) клеточных пластов иммортализованных МСК человека, согласно ранее разработанному протоколу (обработка детергентом CHAPS и ДНКазой I типа). Первично выделенные МСК жировой ткани человека (биобанк Института регенеративной медицины МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, ID: MSU_MSC_AD) высаживали на дВКМ или в качестве контроля на культуральный пластик, в том числе покрытый человеческим рекомбинантным фибронектином, и оценивали активацию внутриклеточных сигнальных путей (MAPK/ERK, передачу сигнала от интегринов, канонический Wnt-и YAP/TAZ-сигналинг) с помощью вестерн блоттинга.

Ранее мы показали, что дВКМ ускоряет индуцированную дифференцировку МСК в адипогенном и остеогенном направлениях, но сам не запускает дифференцировку. Было обнаружено, что в МСК при культивировании на дВКМ повышено соотношение основных участников сигнальных путей pERK/ERK и pFAK/FAK, что указывает на активацию этих клеток и запуск интегринового

сигналинга. Мы выявили повышение в этих клетках содержания неактивного pYAP и снижение содержания активного бета-катенина в ядерной фракции по сравнению с контрольными клетками.

Полученные данные позволяют предположить, что МСК, культивирующиеся на дВКМ, находятся в активированном, но еще не коммитированном состоянии, и способны эффективнее отвечать на специфические дифференцировочные стимулы.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 19-75-30007, получение ВКМ и изучение влияния ВКМ на дифференцировку МСК) и РФФИ (проект № 19-315-90060, работы по исследованию механизмов регуляции дифференцировки МСК на дВКМ).

Ч.К. Нуриева, Е.А. Науменко, Е.В. Рожина,
Е.Ю. Закирова, Ф.С. Ахатова,
И.Д. Гурьянов, Р.Ф. Фахруллин

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ТРЁХМЕРНЫХ
КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ ПЕЧЕНИ**

Казанский федеральный университет, Казань,
Россия

C.K. Nurieva, E.A. Naumenko, E.V. Rozhina,
E.Yu. Zakirova, F.S. Akhatova,
I.D. Guryanov, R.F. Fakhrullin

**CULTIVATION OF THREE-DIMENSIONAL CELL
LIVER MODELS**

Kazan Federal University, Kazan, Russia

chulpan.nurieva.97@gmail.com

Последние достижения в области трехмерной технологии культивирования клеток включают использование плюрипотентных стволовых клеток и взрослых стволовых клеток, которые культивируются *in vitro* для формирования самоорганизующихся систем. Органоиды — это самоорганизующиеся многоклеточные структуры, которые повторяют структуру, функции органов и могут использоваться для моделирования развития, поддержания и восстановления органов *ex vivo*. Модельные органоиды могут быть получены из дифференцированных клеток, которые обладают необходимыми функциональными свойствами. Нами были получены клеточные сфероиды из двух типов клеток: HepG2 (гепатома человека) и HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены) в качестве модели печеночного органоида. Выявлено, что клетки гепатомы формировали плотный органоид, тогда как клетки эндотелия распределялись в его толще, имитируя кровеносные сосуды. Также были сформированы сфероиды из первичных гепатоцитов крысы. Оценка физиологического состояния клеток в их составе выявила наличие гипоксического ядра, характерного для трёхмерных клеточных структур. В целом, получение физиологически полноценных сфероидов из первичных клеток печени, не способных к длительному культивированию в культуре, является важным для дальнейшего использования 3D культур в создании моделей патологических изменений печеночной ткани. На следующем этапе нами были выделены клетки печеночного протока (по протоколу компании STEMCELL Technologies), среди которых предположительно имеются стволовые клетки печени, в частности, перисинусоидальные клетки. Клеточные суспензии заключали в купол из белкового матрикса Matrigel, который создаёт необходимые физико-химические условия для формирования гепатоцеллюлярных

органойдов. Полученные клеточные структуры были проанализированы с привлечением методов иммунофлуоресцентного окрашивания с последующей микроскопией. Выявлено, что часть клеток, формирующих полученные органойды, позитивно окрашивались на десмин, что является одним из маркеров перисинусоидальных клеток. Далее мы планируем проведение дифференцировки клеток в составе органойдов для получения зрелых форм и моделирования начальных стадий фиброза.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00353.

**А.В. Панова, М.В. Черноуцкий,
Н.В. Костюк, М.Б. Белякова**

**ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ЭКСПЛАНТОВ РАЗНЫХ ТКАНЕЙ ДЛЯ
ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ ХОНДРОБЛАСТОВ**

*Тверской государственный медицинский
университет, Тверь, Россия*

**A.V. Panova, M.V. Chernorutskiy,
N.V. Kostiuk, M.B. Belyakova**

**EVALUATION OF THE POSSIBILITY OF USING
VARIOUS TISSUE EXPLANTS FOR OBTAINING
OF CHONDROBLAST CULTURE**

Tver State Medical University, Tver, Russia

paanlip@mail.ru

Оптимизация получения культур хондробластов из эксплантов соединительных тканей актуальна как для фундаментальных исследований, так и в решении прикладных задач в области регенеративной медицины суставов. В данной работе прослеживается роль контактного окружения в хондрогенезе популяции при культивировании различных соединительнотканых эксплантов.

Клетки получали миграцией из эксплантов жировой ткани паховой области или коленного хряща крысы при культивировании в среде DMEM с низким содержанием глюкозы/F12, с добавлением фетальной или взрослой бычьей сыворотки. Культуры, полученные на фетальной сыворотке, пассировали 1–2 раза, и переводили на взрослую сыворотку. Экспланты, инкубированные изначально только на бычьей сыворотке, давали начало монослойной популяции без пересева и получали хондрогенную добавку (инсулин и дексаметазон) по достижении конfluence колонии, обрастающей эксплант. Чашки окрашивали альциановым синим, нильским синим, трихромом по Маллори.

Липофильное окрашивание показало, что адипоциты эксплантов теряют липидные капли, пролиферируют и обретают фибробластоподобную морфологию, причем дедифференцировка более отчетливо прослеживается в среде с бычьей сывороткой. Экспланты хряща, при стимуляции пролиферации фетальной сывороткой, также образуют фибробластоподобный застил. Пассированные клетки разного происхождения способны к хондрогенной индукции, что подтверждалось накоплением гликозаминогликанов. Лакуноподобные структуры образовывались позже, в тяжах и сфероидях, где также визуализировались волокна коллагена. Характерно, что при выращивании

популяции из экспланта хряща без пересева и на бычьей сыворотке, вокруг тканевого фрагмента образуется три-четыре двумерных слоя морфологически идентичных ткани капсул с маловолокнистым коллагеном, а периферическая часть популяции формирует более длинные волокна и небольшие включения гликозаминогликанов. Витамин D ограничивает хондрогенез в культуре. В пассажах дедифференцированных адипоцитов полисахаридные капсулы были выражены в нодусах с небольшим содержанием волокнистого коллагена.

Таким образом, созреванию хондроцита в культуре способствует контактное окружение, причем значимым фактором хондрогенеза является индукция синтеза коллагена. Это позволяет успешно использовать экспланты не только хряща, но и жировой ткани для получения хондробластов в культуре.

**Д.А. Переплетчикова^{1,2}, Ю.И. Хорольская¹,
К.Э. Журенков¹, О.И. Александрова¹**

**ЛИМБАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК
МОДЕЛЬНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ
ВЛИЯНИЯ МЕСТНОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ
НА КЛЕТОЧНУЮ СОСТАВЛЯЮЩУЮ
ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ
РОГОВИЦЫ**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

**D.A. Perepletchikova^{1,2}, Y.I. Khorolskaya¹,
K.E. Zhurenkov¹, O.I. Alexandrova¹**

**LIMBAL STEM CELLS AS A MODEL TEST-
SYSTEM FOR STUDYING THE EFFECTS
OF THE LOCAL PHARMACOTHERAPY ON THE
CELLULAR COMPONENTS OF CORNEAL
TISSUE-ENGINEERED CONSTRUCTIONS**

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

*² Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic
University, Saint-Petersburg, Russia*

dasha_perepletch@mail.ru

Патологическое состояние глазной поверхности, при котором эпителий роговицы замещается конъюнктивальным, носит название лимбальной недостаточности (ЛН). ЛН связана с дисфункцией или гибелью лимбальных стволовых клеток (ЛСК). Одним из методов лечения ЛН является трансплантация тканеинженерных конструкций (ТИК) на основе ЛСК, которая всегда сопровождается фармакотерапией. Большое количество клинических и экспериментальных исследований демонстрируют, что применение препаратов местного действия может инициировать изменения в структуре клеток и способствовать некрозу. Именно поэтому вероятность успеха зрительной реабилитации после пересадки трансплантатов, может значительно снизиться из-за токсичности препаратов, применяемых в офтальмохирургии. Для того, чтобы уменьшить риски возникновения побочных эффектов, связанных с цитотоксическим воздействием лекарственных средств на клеточный компонент, необходим рациональный подбор офтальмологических капель.

Цель настоящей работы заключалась в изучении возможности использования лимбальных стволовых клеток в качестве модельных тест-систем для оценки цитотоксичности офтальмологических препаратов, применяемых в офтальмохирургии.

ЛСК были выделены из фрагментов ткани роговичного лимба кроликов породы Шиншилла. В работе использовали клетки 6-го пассажа. Объектом исследования являлись глазные капли, относящиеся к группам глюкокортикоидов, анестетиков, антисептиков. Цитотоксичность препаратов в отношении тест-систем на основе ЛСК оценивали по морфологическому состоянию клеток, их пролиферативной и метаболической активности с помощью световой и конфокальной микроскопии, МТТ-теста и системы клеточного анализа xCELLigence.

В ходе исследования было выявлено, что внутри фармакологических групп препараты различаются по степени и характеру токсичности. Большинство препаратов проявляет токсичность в первые часы после применения, что может быть критично для жизнеспособности клеток, трансплантируемых в составе ТИК, а также резидентных стволовых клеток. Это позволяет косвенно прогнозировать, что неправильно подобранный препарат или его концентрация могут привести к гибели трансплантированных клеток и заметно снизить эффективность репаративных процессов.

Использование лимбальных стволовых клеток в качестве модельных тест-систем для оценки цитотоксичности офтальмологических препаратов может способствовать оптимальному подбору местной фармакотерапии при лечении лимбальной недостаточности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90146.

У.И. Поденкова^{1,2}, Е.И. Бахмет², Т.И. Зюбко²,
И.В. Зубарев^{1,2}, А.Н. Томилин², А.С. Цимоха²

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ИММУНОПРОТЕАСОМ НАБЛЮДАЕТСЯ В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ ИЗ НАИВНОГО В ПРАЙМИРОВАННОЕ СОСТОЯНИЕ

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

U.I. Podenkova^{1,2}, E.I. Bahmet², T.I. Zyubko²,
I.V. Zubarev^{1,2}, A.N. Tomilin², A.S. Tsimokha²

EXPRESSION OF IMMUNOPROTEASOME GENES IS OBSERVED IN DIFFERENTIATION OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS FROM A NAIVE TO A PRIMED STATE

¹ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia
² Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

uliana.podenkova@gmail.com

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) обладают способностью противостоять повреждающим факторам, которые могли бы привести к выходу из состояния плюрипотентности и старению. Так, показано, что ЭСК имеют повышенную устойчивость к повреждениям генома, пониженную частоту мутаций и продуцируют гораздо меньше радикалов кислорода по сравнению с дифференцированными клетками. Это свойство обеспечивается усиленной активностью защитных систем клетки, включая поддержание белкового гомеостаза (протеостаза). Убиквитин-протеасомная система обеспечивает деградацию более 90% всех белков в клетке, включая избыточные и поврежденные, и, тем самым, является одним из ключевых участников протеостаза и, следовательно, задействована

в поддержании плюрипотентности ЭСК и в выходе из нее в процессе дифференцировки. Протеасома содержит три каталитически активные субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$, которые при определенных условиях могут замещаться на индуцибельные — $\beta 1i/LMP2$, $\beta 2i/MECL1$ и $\beta 5i/LMP7$. В такой конфигурации протеасома называется иммунопротеасомой и принимает участие в процессе презентации антигена при иммунном ответе в составе молекулы МНС-I. В последнее время появляются исследования, предполагающие роль иммунопротеасом в поддержании плюрипотентности ЭСК в процессе клеточной дифференцировки.

Согласно данным литературы, наблюдается экспрессия генов иммунопротеасом в ЭСК человека, и в процессе дифференцировки происходит постепенное снижение уровня их экспрессии. У мыши в ЭСК не экспрессируются гены иммунопротеасом, однако, уровень экспрессии этих генов увеличивается при дифференцировке ЭСК. Мы не обнаружили экспрессии генов иммунопротеасом ни в ЭСК мыши, ни в процессе их дифференцировки. Однако мы показали, что экспрессия генов иммунопротеасом происходит лишь при дифференцировке ЭСК в эпигенетические стволовые клетки. Полученные нами данные подтверждают данные сравнения транскриптомов ЭСК мыши (наивных плюрипотентных клеток) и эпигенетических стволовых клеток (праймированных плюрипотентных клеток), и свидетельствует об участии иммунопротеасом в поддержании стволовых клеток в состоянии праймированной плюрипотентности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (19-29-04117).

А.Н. Поджилкова¹, В.Г. Шуватова²,
Ю.П. Семочкина², Г.А. Посыпанова²

ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ 3D-КУЛЬТУРЫ MCF7, ОБОГАЩЕННОЙ ОПУХОЛЕВЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ, К ДОЦЕТАКСЕЛУ И ИОНИЗИРУЮЩЕМУ ИЗЛУЧЕНИЮ

¹ РТУ МИРЭА, (МИРЭА — Российский технологический университет), Москва, Россия
² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

A.N. Podzhilkova¹, V.G. Shuvatova²,
Yu.P. Semochkina², A.G. Posypanova²

THE STUDY OF SENSITIVITY OF MCF7 3D CELL CULTURE, ENRICHED WITH TUMOR STEM CELLS, TO DOCETAXEL AND IONIZING RADIATION

¹ RTU MIREA, (MIREA — Russian Technological University), Moscow, Russia
² National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

46254A@gmail.com

В настоящее время накоплено значительное количество экспериментальных данных, свидетельствующих о преимущественной роли опухолевых стволовых клеток (ОСК) в инициации и развитии опухоли. ОСК отличаются высокой устойчивостью к воздействию повреждающих факторов, таких как химиотерапевтические препараты или ионизирующее излучение.

Целью данной работы являлось изучение чувствительности 3D-культуры (маммосфер), полученных из клеток аденокарциномы молочной железы человека линии

MCF7, к воздействию противоопухолевого цитостатика доцетаксела и гамма- и нейтронного излучения.

Методы. Маммосферы культивировали в среде DMEM/F12 без фенолового красного, содержащей инсулин, EGF и bFGF, в низкоадгезивных чашках Петри. После дезагрегирования маммосфер на разных пассажах (генерациях, G) определяли долю ОСК (CD44⁺/CD24⁻) с помощью проточной цитофлуориметрии. 3D-культуру также характеризовали с помощью непрямого иммуноцитохимического окрашивания антителами к виментину и маркеру пролиферации Ki67.

Клетки облучали на установке «ГУТ-200М» (γ -излучение, ⁶⁰Co) и в коллимированном пучке нейтронов и гамма-квантов ядерного реактора ИР-8 (смешанное гамма-нейтронное (γ, n) излучение). Эффективность воздействия оценивали по изменению выживаемости клеток, клоногенной активности, изменению параметров клеточного цикла.

Результаты. Клетки линии MCF7 при культивировании в указанных выше условиях образуют плавающие сферические колонии — маммосферы. Показано, что в 3D-культуре значительно возрастала доля ОСК с фенотипом CD44⁺/CD24^{-low}: от 0,9% (содержание ОСК в 2D-культуре MCF7) до 10–20% в генерациях G2–G6. Обнаружено, что клетки маммосфер проявляли высокую устойчивость к доцетакселу в сравнении с 2D-культурой при длительном культивировании клеток (6 сут), которая проявлялась в увеличении значения IC50, увеличении клоногенной активности и снижении доли клеток в S/G2/M фазах клеточного цикла. Показано, что 3D-культура MCF7 была значительно более устойчивой к доцетакселу и γ -излучению по сравнению с исходной 2D-культурой: при облучении в дозе 2 Гр разница по выживаемости составила 40%. При этом в популяции выживших клеток значительно возрастала доля ОСК.

А.В. Полянская¹, Д.Ф. Гончарова¹,
А.С. Мусорина², Г.Г. Полянская², Д.Е. Бобков²

АНАЛИЗ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЯ α -АКТИНИНА-4 И RHOA В ПРОЦЕССЕ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

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

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

A.V. Polyanskaya¹, D.F. Goncharova¹,
A.S. Musorina², G.G. Polyanskaya², D.E. Bobkov²

ANALYSIS OF NUCLEAR CYTOPLASMIC REDISTRIBUTION OF α -ACTININ-4 AND RHOA DURING REPLICATIVE AGING OF HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED MSCS

¹ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

polyanskaya.nastya18@gmail.com

Одним из существенных признаков репликативного старения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) является уменьшение клеточной подвижности и реорганизация цитоскелета. Нарушение процессов миграции способствует ухудшению тканевой репарации. Поэтому для использования МСК в регенеративной медицине необходимо знать характер процесса репликативного

старения в конкретной линии. Исследование направлено на исследование изменений в организации сократительного аппарата МСК жировой ткани человека (ADH MSC) в процессе репликативного старения.

В ходе данной работы изучены структурные особенности распределения актин-связывающего белка α -актина-4, а также малой ГТФазы RhoA в клетках ADH MSC на различных стадиях репликативного старения.

Методами иммунофлуоресцентного анализа и конфокальной микроскопии исследована динамика колокализации белков RhoA, α -актина-4 с ядром (ДНК) и с F-актином на 8–16 пассажах в клетках ADH MSC. Для оценки структурной целостности актинового цитоскелета был произведен анализ его локальной фрактальной размерности (D) [1].

В результате построения линейной регрессии по коэффициентам колокализации на изученных пассажах было обнаружено, что при увеличении номера пассажа происходит снижение колокализации с F-актином как α -актина-4, так и RhoA. Колокализация α -актина-4 и RhoA с ядрами увеличивается при увеличении номера пассажа, что может свидетельствовать о том, что в ходе репликативного старения α -актина-4 и RhoA из цитоплазмы частично перераспределяются в ядро. На данный момент роль α -актина-4 и RhoA в ядре мало понятна и подлежит дальнейшему исследованию. В ходе анализа фрактальной размерности актинового цитоскелета обнаружено, что в первоначальное снижение D в ходе культивирования сменяется его увеличением, с минимальным значением на 11 пассаже. Эти результаты свидетельствуют об обратимом снижении структурной целостности актинового цитоскелета в процессе репликативного старения.

Литература:

1. Alhussein G. et al. A spatiotemporal characterization method for the dynamic cytoskeleton. *Cytoskeleton* 2016; 73(5): 221–232.

А.Н. Попова^{1,2,3}, О.С. Роговая^{1,2},
А.С. Артюхов², Н.А. Евтушенко²,
А.В. Васильев^{1,2,3}, Е.А. Воротеляк^{1,2,3}

ВЛИЯНИЕ КРИОХРАНЕНИЯ НА ПОПУЛЯЦИЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

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

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

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

A.N. Popova^{1,2,3}, O.S. Rogovaya^{1,2}, A.S. Artyuhov²,
N.A. Evtushenko², A.V. Vasilyev^{1,2,3}, E.A. Vorotelyak^{1,2,3}

INFLUENCE OF CRYOSTORAGE ON STEM CELL POPULATION IN HUMAN KERATINOCYTES

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

popova.anna.n@gmail.com

В течение многих лет создание эпидермального эквивалента остается актуальной задачей для

регенеративной медицины. Одновременное сохранение недифференцированного фенотипа и высокого пролиферативного потенциала в культуре эпидермальных кератиноцитов (ЭКЦ) человека необходимо для формирования многослойного пласта клеток, в котором достигнут баланс между пролиферацией и дифференцировкой. Этап криохранения предположительно влияет на популяцию стволовых клеток, поэтому нашей задачей было сравнение характеристик клеток в культуре до и после криохранения.

Экспрессию мРНК генов гемидесмосом (интегрины $\alpha 6$, $\beta 4$ и $\beta 1$), характерных для базальных кератиноцитов кожи, оценивали методом ПЦР в реальном времени в первичной культуре ЭКЦ до (p0) и после криохранения (p1) (1 и 7 сутки). Изменение количества стволовых клеток с фенотипом (CD71-/integrin $\beta 4+$) в культуре ЭКЦ до и после криохранения (1 сутки после разморозки) оценивали методом проточной цитометрии. Оценка экспрессии белка интегрин $\alpha 6$ до и после (1,3 сутки) криохранения проводилась методом вестерн блот. Пролиферативный потенциал оценивали методом CFE (J.G. Rheinwald, H. Green, 1975) до криохранения на 2м пассаже (p2) и после криохранения (1 пассаж и 2й пассаж после 3 и 10 суток культивирования p1), а также по способности ЭКЦ формировать эпидермальный эквивалент: кератиноциты культивировали на коллагеновом геле в течение 7 суток с применением этапа культивирования на границе с воздухом. Криосрезы препаратов многослойного эпидермиса окрашивали гематоксилином-эозином.

Через 24 часа после разморозки прикрепленными к пластику остаются только $12,5\% \pm$ кератиноцитов. В этой популяции наблюдается снижение экспрессии мРНК интегринов $\alpha 6$ и $\beta 1$; повышение экспрессии мРНК интегрин $\alpha 6$ происходит к 7 суткам. При этом экспрессия белка интегрин $\alpha 6$ одинакова до и после (1сутки) разморозки, но снижается к 3 суткам. Кроме того, есть тенденция к увеличению процента кератиноцитов со стволовым фенотипом (CD71-/integrin $\beta 4+$) после разморозки (1 сутки). При культивировании кератиноцитов на геле происходит формирование многослойной структуры, близкой к нативному эпидермису. Было обнаружено увеличение пролиферативного потенциала в культуре кератиноцитов после криохранения (методом CFE): голоклонов в 14 раз больше после криохранения (2й пассаж после 10 суток культивирования p1), но при этом низкое число голоклонов на 2м пассаже после 3 суток культивирования p1. Кератиноциты сразу после криохранения колонии не формировали.

Вследствие криохранения наблюдается транзитное снижение экспрессии генов гемидесмосом в культуре базальных кератиноцитов. В результате этого, вероятно, происходит селекция наименее дифференцированных кератиноцитов, несущих на мембране максимальное количество молекул интегрин $\alpha 6$, что дает им возможность более прочной адгезии к матриксу.

Работа выполнена в рамках госзадания ИБР РАН 2020 года.

Е.Д. Порохова¹, Л.А. Сафиуллина¹,
Е.О. Шунькин², К.А. Юрова²

СВЯЗЬ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ С МОРФОЛОГИЕЙ И МИНЕРАЛИЗУЮЩИМ ПОТЕНЦИАЛОМ СТРОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

² Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

E.D. Porokhova¹, L.A. Safiullina¹,
E.O. Shunkin², K.A. Yurova²

THE RELATIONSHIP OF CYTOKINES AND CHEMOKINES WITH THE MORPHOLOGY AND MINERALIZING POTENTIAL OF THE STROMAL FRACTION OF HUMAN BLOOD MONONUCLEAR LEUKOCYTES

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

² Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Saflee4505@mail.ru

Заболевания опорно-двигательного аппарата (ЗОДА) сложно поддаются лечению и нередко приводят к инвалидности пациентов, поэтому улучшение диагностики и лечения ЗОДА является одной из важных медико-социальных проблем. Целью исследования стала оценка возможного влияния цитокинов и хемокинов на морфологию и остеогенный потенциал стромальной фракции мононуклеарных лейкоцитов (МНЛ) крови человека после длительного культивирования. МНЛ, выделенные из венозной крови здоровых добровольцев, культивировали в течение 21 суток в питательной среде без остеогенных добавок, прилипающие клетки фиксировали в парах формалина и окрашивали ализариновым красным, проводили морфометрические подсчеты. Для измерения концентрации 22 цитокинов в супернатантах использовалась проточная цитометрия. В длительной культуре, помимо МНЛ с типичной морфологией, присутствовали фибробластоподобные клетки (ФК), что совпадает с литературными данными [1]. При окраске ализариновым красным отмечались небольшие единичные фокусы кальцификации межклеточного вещества вокруг ФК, в незначительном отдалении от ФК и в области межклеточного контакта МНЛ с ФК, что говорит о дистантном и контактном влиянии МНЛ на остеогенную дифференцировку и минерализацию клеточной культуры, обусловленную ФК. Была выявлена прямая корреляционная связь между количеством участков минерализации и числом ФК. В лунках с максимальным числом ФК концентрация провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6 и IL-17 была, соответственно, в 5, 10 и в 44 раза выше, а противовоспалительного хемокина MCP-1 (MCAF) — в 26 раз ниже. Таким образом, дифференцировка потомков МНЛ в остеобласты с последующей кальцификацией межклеточного матрикса может быть обусловлена ауто- и паракриной секрецией компонентов цитокиновой сети, обладающих известным остеомодулирующим потенциалом [2].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10031).

Литература:

1. Хлусов И. А., Нечаев К. А., Шевцова Н. М., и др. К вопросу о фибробластоподобных клетках в периферической крови человека // Гены и клетки. 2010. № 4. С.72–78.
2. Loi F., Córdova L.A., Pajarinen J., et al. Inflammation, fracture and bone repair. Bone. 2016. V. 86. P. 119–130.

А.Ю. Ратушный, М.И. Ездакова

**АНГИОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ
КЛЕТОК ПРИ РЕПЛИКАТИВНОМ СТАРЕНИИ**

*Институт медико-биологических проблем РАН,
Москва, Россия*

A.Y. Ratushnyy, M.I. Ezdakova

**ANGIOGENIC POTENTIAL OF REPLICATIVE
SENESCENT MESENCHYMAL STEM CELLS**

Institute of Biomedical Problems, RAS, Moscow, Russia

Ratushkin@mail.ru

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) поддерживают во взрослом организме процессы восстановления и обновления тканей. Секретом МСК может способствовать цитопротекции и восстановлению тканей при повреждении. Клеточное старение приводит к значительным модификациям морфофункционального состояния и изменениям межклеточного взаимодействия. Цель данной работы заключалась в изучении ангиогенного потенциала сенесцентных МСК. Наибольший интерес представляет ассоциированный со старением секреторный фенотип (SASP). Его консервативную основу составляют провоспалительные цитокины, но состав может варьировать в зависимости от типа клеток, их тканевого источника и способа индукции клеточного старения.

МСК выделяли из жировой ткани здоровых доноров (женщины, 35–50 лет). Клетки длительно поддерживали в культуре до лимита Хейфлика (более 20 пассажей) и подтверждения сенесцентного состояния по ряду маркеров. Ангиогенную активность кондиционированной среды (КС) сенесцентных и «молодых» МСК оценивали на модели формирования сосудов в хориоаллантоисной мембране (ХАО) *in ovo* с использованием эмбрионов японских перепелов. Отдельные процессы, ассоциированные с ангиогенезом, были изучены на моделях образования капиллярноподобных структур в Матригеле и ненаправленной миграции эндотелиальных клеток (ЭК). Около 100 различных секретиремых медиаторов было изучено с использованием ИФА, мультиплексного анализа, дот-блоттинга и количественной ПЦР.

Результаты указывают на то, что сенесцентные МСК обладают меньшей ангиогенной активностью, чем «молодые» клетки. При этом, данный эффект в полной мере проявляется лишь в комплексных моделях, приближенных к условиям *in vivo*, где одновременно присутствует множество клеточных и неклеточных элементов, участвующих в ангиогенезе. На элементарных моделях, таких как Матригель и ненаправленная миграция ЭК, эффект слабо выражен или отсутствует вовсе. Анализ КС не выявил значительного изменения концентрации VEGF, ключевого регулятора ангиогенеза. В то же время, репликативное старение приводит преимущественно к повышению паракринной активности МСК. Происходит увеличение содержания как про- (FGF-2, uPA, IL-6, IL-8 и др.), так и антиангиогенных факторов (IL-4, IP-10, PF4, Activin A, DPPIV и др.). Таким образом, модификация секреторного

фенотипа, ассоциированная с репликативным старением, приводит к снижению ангиогенного потенциала МСК, выделенных из жировой ткани человека.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00150.

М.Г. Ратушняк, Ю.П. Семочкина

**ПОВЫШЕНИЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ
ОБЛУЧЕННЫХ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК МЫШИ С ПОМОЩЬЮ ФАКТОРОВ,
СЕКРЕТИРУЕМЫХ НЕОБЛУЧЕННЫМИ
НЕЙРАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ
И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ
КЛЕТКАМИ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ**

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

M.G. Ratushnyak, Y.P. Semochkina

**MURINE NEURAL STEM CELLS SURVIVAL
AFTER IRRADIATION IS INCREASED BY THE
FACTORS SECRETED BY NON-IRRADIATED
NEURAL STEM CELLS AND MESENCHYMAL
STEM CELLS FROM ADIPOSE TISSUE**

NRC "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

ratushnyak_marya@mail.ru

При лучевой терапии опухолей мозга и области головы и шеи обнаружена гибель нейральных стволовых клеток (НСК). Цель данной работы — изучить возможность повышения выживаемости γ -облученных НСК с помощью факторов, секретиремых необлученными НСК или мезенхимальными клетками из жировой ткани (МСК-ЖТ) в экспериментах *in vitro*.

НСК выделяли из головного мозга новорожденных мышат в стерильных условиях [1]. Клетки облучали на установке ГУТ-200М (Co⁶⁰) в культуральной среде в дозах 1 и 2 Гр. Контрольные и облученные НСК высевали в культуральные 24х-луночные планшеты, после чего в каждую лунку планшета помещали проницаемые мембранные вкладыши с необлученными стволовыми клетками. Выживаемость облученных НСК оценивали через 72 ч культивирования.

Облучение НСК в дозах 1 и 2 Гр приводило к снижению выживаемости клеток через 72 ч после воздействия до 57±2% и 44±3% от необлученного контроля, соответственно. Выживаемость облученных в дозе 1 Гр НСК после ко-культивирования с необлученными НСК, которые находились в проницаемых вкладышах, была достоверно выше и составляла 91±3%, а после облучения в дозе 2 Гр — 70±2%.

Выживаемость облученных в дозе 1 Гр НСК после ко-культивирования с необлученными МСК-ЖТ в аналогичных условиях, через 72 ч после воздействия была достоверно выше, и составляла 86±4%, а после облучения в дозе 2 Гр повышалась до 60±4%.

Выживаемость НСК, облученных в дозе 1 и 2 Гр при прямом ко-культивировании облученных НСК с необлученными НСК, повышалась до 100% и 88±4% соответственно.

Ко-культивирование с использованием проницаемых мембранных вкладышей позволяет факторам, секретиремым необлученными НСК и МСК-ЖТ, в том числе экзосомам, защищать НСК от действия γ -излучения, что приводит к повышению их выживаемости. При прямом ко-культивировании необлученных и облученных НСК,

более высокое повышение выживаемости облученных клеток связано, по-видимому, с действием не только секретруемых факторов, но и с межклеточными взаимодействиями.

Работа выполнена в рамках стипендии Президента РФ СП-2490.2019.4.

Литература:

1. Посыпанова Г.А., Ратушняк М.Г., Высоцкая О.В., Глухов А.И., Семочкина Ю.П., Родина А.В., Москалева Е.Ю. Защита нейральных стволовых клеток от генотоксических воздействий с помощью факторов, секретруемых МСК. // Молекулярная медицина. — 2018. — Т. 16, № 6. — С. 28–34.

А.В. Ревитцер, Ю.А. Негуляев

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРЕСТРОЕК ФИБРИЛЛЯРНОГО АКТИНА В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ С ПОМОЩЬЮ ФРАКТАЛЬНОЙ РАЗМЕРНОСТИ МИНКОВСКОГО

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

A.V. Revittser, Y.A. Negulyaev

ANALYSIS OF F-ACTIN ALTERATIONS USING MINKOVSKY'S FRACTAL DIMENSION

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

eetytnet@gmail.com

Актиновый цитоскелет участвует во всех процессах, необходимых для нормальной жизнедеятельности клетки, в том числе и в клеточной миграции, играющей ключевую роль в развитии организма, иммунных реакциях, регенерации поврежденных тканей и метастазировании раковых клеток. Изучение различных биологически активных агентов, влияющих на актиновый цитоскелет и связанную с ним клеточную подвижность, является актуальной темой современной клеточной биологии. Несмотря на то, что нам доступно визуализировать фибриллярный актин в высоком разрешении для детального наблюдения его морфологии, все еще не хватает подходов для численной оценки перестроек цитоскелета с целью выявления эффекта того или иного биологически активного агента. Актиновый цитоскелет — сложная самоподобная структура, поэтому к ней применимы понятия фрактальной геометрии. Фрактал в широком понимании это множество точек, имеющее дробную метрическую размерность (фрактальную размерность), которая может являться численным параметром перестроек цитоскелета, характеризую сборку или разборку, основываясь на форме изображения, а не на интенсивности флюоресценции изображения.

Целью нашей работы было использовать измерение фрактальной размерности Минковского в исследовании влияния предсердного натрийуретического пептида (ПНП) на цитоскелет мезенхимных стволовых клеток (МСК, выделены из жировой ткани и охарактеризованы). Фибриллярный актин в клетке выявляли с помощью окраски родамином, конъюгированным с фаллоидином, подсчет фрактальной размерности проводили в ImageJ с использованием плагина FracLac. Было обнаружено, что фрактальная размерность у актинового цитоскелета МСК в контрольном образце составляет $1,57 \pm 0,02$. После инкубации МСК в течение 24 ч с 10 нМ ПНП фрактальная размерность составляла $1,52 \pm 0,01$. Для МСК,

инкубированных в течение 24 ч с 1000 нМ ПНП, этот параметр составлял $1,59 \pm 0,01$. Полученные данные показали, что действие 10 нМ ПНП в течение 24 ч приводит к разборке фибриллярного актина МСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 18-15-00106).

**Д.П. Ревокатова^{1,4}, А.А. Горкун^{1,2,3},
И.М. Зурина^{1,2,3}, Д.А. Никишин^{4,5},
Н.В. Кошелева^{1,2,4}, Е.Е. Устинова¹,
Т.Д. Колокольцова^{1,2}, И.Н. Сабурин^{1,2}**

ОСТЕОГЕНЕЗ И АНГИОГЕНЕЗ В СФЕРОИДАХ ИЗ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

¹ *ФГБНУ НИИ общей патологии и патологической физиологии, Москва, РФ*

² *ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования, Москва, РФ*

³ *Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, институт регенеративной медицины, Москва, РФ*

⁴ *Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, РФ*

⁵ *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, РФ*

**D.P. Revokatova^{1,4}, A.A. Gorkun^{1,2,3}, I.M. Zurina^{1,2,3},
D.A. Nikishin^{4,5}, N.V. Kosheleva^{1,2,4}, E.E. Ustinova¹,
T.D. Kolokoltsova^{1,2}, I.N. Saburina^{1,2}**

OSTEOGENESIS AND ANGIOGENESIS IN SPHEROIDS FROM HUMAN MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS

¹ *FSBSI Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

² *FSBEI FPE "Russian Medical Academy of Continuous Professional Education" of the Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia*

³ *Sechenov First Moscow State Medical University, Institute for Regenerative Medicine, Moscow, Russia*

⁴ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia*

⁵ *Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

revokatova.d@gmail.com

В настоящее время при создании биоэквивалентов для реконструкции дефектов костной ткани основным фактором, лимитирующим регенерацию, остается недостаток васкуляризации. В настоящее время основным подходом к созданию васкуляризованной ткани является сокультивирование с эндотелиальными прогениторными клетками. При совместном 2D культивировании эндотелиальных прогениторных клеток и остеогенных предшественников — мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) происходит более ранняя дифференцировка клеток в обоих направлениях. В условиях трехмерной культуры данные процессы остаются малоизученными, тогда как показано, что компактная упаковка клеток внутри сфероида способствует образованию специфического микроокружения и более эффективной остеогенной дифференцировке. Таким образом, целью данного исследования было изучение *in vitro* взаимодействия в сфероиде ММСК, одновременно дифференцирующихся в ангиогенном и остеогенном направлениях.

В данной работе были использованы ММСК, полученные из жировой ткани человека. На 4-ом пассаже клетки переносили на агарозные планшеты в условия 3D культивирования в концентрации 3.3×10^6 клеток на мл. Было изучено 4 группы сфероидов: 1) контрольная группа, 2) группа с ангиоиндукцией, 3) остеоиндукцией и 4) группа с двойной индукцией. Сфероиды были охарактеризованы с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), иммуноцитохимического анализа (ИЦХ) и ПЦР в реальном времени на 7, 14 и 21 сутки 3D культивирования.

Результаты СЭМ показали, что все сфероиды в зависимости от группы индукции имеют эпителиоподобные клетки на поверхности и стромальные клетки с высоким содержанием внеклеточного матрикса в центральной зоне сфероида. Согласно результатам ИЦХ на 7 сутки 3D культивирования во всех группах, включая контрольную, был синтез маркеров эндотелиальной дифференцировки — Flk-1 и CD31 и синтез остеопонтина, остеокальцина — маркеров остеогенеза, что свидетельствует о наличии частичного спонтанного ангио- и остеогенеза. Результаты ИЦХ также показали, что индукция в ангиогенном направлении и двойная индукция значительно увеличивают синтез остеопонтина на 7 и 14 сутки, что свидетельствует о том, что ангиогенез может стимулировать ранние этапы остеогенеза. В пользу этого также свидетельствует увеличение экспрессии Osterix — раннего фактора остеогенеза в группе с двойной индукцией.

Таким образом, 3D культура из ММСК жировой ткани человека способна к частичному спонтанному ангиогенезу и остеогенезу. Двойная индукция стимулирует дифференцировку клеток сфероида в остеогенном направлении. Это открывает новые перспективы получения васкуляризованных биоэквивалентов костной ткани *in vitro* для эффективного восстановления крупных дефектов кости.

Исследование было поддержано фондом Грант Президента Российской Федерации, грант МК-3776.2019.4.

**Э.В. Рожина, И.Р. Ишмухаметов, А.О. Рожин,
Ф.С. Ахатова, Р.Н. Мингалева, Р.Ф. Фахруллин**
**ПОДЛОЖКИ С НАНОРАЗМЕРНОЙ
ТОПОГРАФИЕЙ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ
НАНОМАТЕРИАЛОВ И ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

*НИЛ Бионанотехнологии ИФМиБ КФУ, Казань,
Россия*

**E.V. Rozhina, I.R. Ishmukhametov, A.O. Rozhin,
F.S. Akhatova, R.N. Mingaleeva, R.F. Fakhrullin**
**NANOPATTERNED SUBSTRATES BASED
ON MAGNETIC NANOMATERIALS AND
POLYMERS FOR MESENCHYMAL STEM CELLS
DIFFERENTIATION**

*Bionanotechnology Laboratory, Institute of Fundamental
Medicine and Biology, KFU, Kazan, Russia*

rozhinaelvira@gmail.com

Физико-химические свойства поверхности играют важную роль в адгезии, влияют на морфологию, пролиферацию и дифференцировку эукариотических клеток. В работе представлены результаты использования магнитных наночастиц для изменения механических свойств поверхностей и оценки последующего роста

и дифференцировки клеток млекопитающих на полученных подложках.

Магнитные наночастицы были получены методом химического осаждения из раствора солей двух- и трехвалентного железа. Анализ наноматериалов проводился с помощью гиперспектральной и темнопольной микроскопии на установке CytoViva (США), а также с помощью атомно-силовой микроскопии. Для получения магнитно-модифицированных поверхностей использовали химически очищенные стекла, на которые наносили магнитные наноматериалы или магнитные наноматериалы с полимером. Объектом исследования были мезенхимальные стволовые клетки (МСК) адипогенного происхождения.

Были получены сферические магнитные наночастицы оксида железа с гидродинамическим диаметром $123 \pm 0,8$ нм и ζ -потенциалом $-47,6 \pm 1,2$ мВ. Для лучшего закрепления наночастиц на стекле их наносили совместно с дезоксирибонуклеиновой кислотой цыпленка (ДНК). С помощью атомно-силовой микроскопии было показано, что наибольшие параметры среднеарифметической шероховатости Ra $90,1 \pm 2,8$ нм характерны для покрытий только с магнитными наночастицами, но такие покрытия нестабильны и легко отделяются от поверхности в культуральной среде. При использовании ДНК шероховатость покрытия снижалась до Ra $30,1 \pm 3,3$ нм, но была более стабильна. Показано, что сферические магнитные наночастицы могут с успехом использоваться для формирования покрытий с разными параметрами шероховатости и адгезии. Оптимальным полимером из исследованных нами для формирования подобных покрытий является ДНК, поскольку способствует равномерному распределению наноматериала по поверхности стекла. Успешно проведена остео- и хондродифференцировка МСК на полученных поверхностях.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров и при поддержке гранта РФФИ (№ проекта 18-29-25057).

А.А. Рябинин, Е.П. Калабушева, Е.А. Воротеляк
**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ГЕНЕРАЦИИ
АУТОЛОГИЧНЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ
И ДЕРИВАТОВ КОЖИ ИЗ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
КЛЕТОК**

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

A.A. Riabinin, E.P. Kalabusheva, E.A. Vorotelyak
**DEVELOPMENT OF TECHNOLOGIES FOR
AUTOLOGOUS SKIN EQUIVALENTS AND SKIN
DERIVATES GENERATION FROM PLURIPOTENT
CELLS**

*Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian
Academy of Sciences, Moscow, Russia*

andrey951233@mail.ru

На текущий момент одной из важных проблем регенеративной медицины является дальнейшее развитие технологий получения и трансплантации живых эквивалентов кожи, которые могут быть использованы как для терапии ряда генетических заболеваний кожи, так и в качестве репрезентативной модели для изучения морфогенеза кожи

и симуляции воздействия различных веществ на нее. Одним из перспективных источников клеточного материала для генерации ЖЭК являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (ЧИПСК). Основной нерешенной проблемой получения ЖЭК являются отличия структуры, клеточного состава и состава внеклеточного матрикса в составе ЖЭК от его нативного аналога, а также отсутствие дериватов кожи.

Целью работы было получить в ходе направленной дифференцировки ЧИПСК эпидермальную и дермальную клеточные линии, пригодные для получения ЖЭК и волосных фолликулов *in vitro*.

В результате дифференцировки ЧИПСК были получены аналог кератиноцитов (ИПСК-Кц) и аналог клеток дермальной папиллы (ДП) волосного фолликула (ИПСК-ДП). Затем полученные клеточные линии были верифицированы при помощи иммуноцитохимического анализа и РВ-ПЦР выявления маркеров кератиноцитов (p63, K14, K18, K10 и др.) и маркеров ДП (версикана, виментина, фибронектина, гладкомышечного актина и др.) соответственно, а также функционального теста на индукцию фолликулогенеза *in vivo* после введения ИПСК-ДП под кожу иммунодефицитных мышей линии *nude* с последующим иммуногистохимическим выявлением эпидермальных маркеров (К6 и K14) в составе сформированных *de novo* кожных органоидов в препаратах, полученных из зоны введения.

На следующем этапе работы ИПСК-ДП и ИПСК-Кц использовали для получения в системе transwell ЖЭК и органоидов, имитирующих ранние стадии фолликулогенеза, в системе «висячая капля». Образцы полученных препаратов использовали для иммуногистохимического выявления маркеров клеток дермальной папиллы (фибронектина и версикана), базальной мембраны (коллаген IV) и кератиноцитов (K14).

Полученные результаты подтверждают целевой фенотип полученных клеточных линий и их способность к взаимной интеграции в трехмерные клеточные системы, что позволяет утверждать, что разработанные методы и полученные клеточные линии могут быть использованы для получения полноценных ЖЭК и дериватов кожи *in vitro*.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ № 16-14-00204.

А.П. Савельева, О.А. Быстрова, М.Г. Мартынова, Е.В. Байдюк, И.Э. Неганова

РОЛЬ АУТОФАГИИ ПРИ ПРЕОДОЛЕНИИ КЛЕТЧНОГО СТАРЕНИЯ МСКЧ В 3D-2D МОДЕЛИ

Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

A.P. Saveleva, O.A. Bystrova, M.G. Martynova, E.V. Baidyuk., I.E. Neganova

THE ROLE OF AUTOPHAGY IN OVERCOMING CELLULAR SCENESCENCE OF MSC IN 3D-2D MODEL

Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

arina.saveleva2019@yandex.ru

Мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки человека (МСКч) способны к самовоспроизведению и дифференцировке в остеогенном, хондрогенном

и адипогенном направлениях. В настоящее время МСКч используют для лечения различных заболеваний, включая болезнь «трансплантат против хозяина», болезнь Крона, сахарный диабет, рассеянный склероз, инфаркт миокарда, печеночная недостаточность, и некоторых других. Однако активное использование этих клеток в трансляционной медицине затруднено, в том числе из-за того, что в условиях *in vitro* МСКч подвергаются клеточному старению, то есть снижению функциональной активности и клеточной пролиферации по мере увеличения количества клеточных пассажей. Bartosh с соавторами (2016) показали, что МСКч поздних пассажей (характеризующиеся экспрессией маркеров клеточного старения) после прохождения фазы «3D-сфероидов», восстанавливают способность к активной пролиферации и обладают типичным фенотипом клеток ранних пассажей. Однако основное внимание исследований наследований 2D-3D-2D культивирования МСКч были направлены на изучение усиленного противовоспалительного эффекта этих клеток, изменений секретоста и более высокой выживаемости. Целью нашего исследования является определение сигнальных путей и клеточных механизмов, ответственных за преодоление клеточного старения МСКч в 2D-3D-2D модели.

3D-сфероиды МСКч были приготовлены с использованием клеток поздних пассажей, экспрессирующих маркеры клеточного старения, с использованием техники «висячих капель». Клеточный цикл и активацию аутофагии в 3D-сфероиде сравнивали с пролиферативной активностью 2D-культивируемых МСКч ранних и поздних пассажей, а также с этими характеристиками у клеток после выхода из 3D-сфероиде. Полученные данные согласуются с данными других групп и подтверждают преодоление клеточного старения МСКч в 2D-3D-2D модели. Кроме того, после выхода из 3D в 2D условие культивирования, МСКч сохраняли нормальный кариотип и высокий уровень экспрессии поверхностных маркеров.

При окрашивании МСКч на аутофагоцитоз (реакция на кислую фосфатазу по Гомори) в цитоплазме клеток ранних пассажей и в клетках, вышедших из 3D-сфероидов, была выявлена низкая активность кислой фосфатазы (КФ), в то время, как клетки в 3D сфероиде характеризовались высокой активностью КФ, характерной для активации этого процесса. Электронно-микроскопические методы исследования совместно с иммунофлуоресцентным окрашиванием на p62, p230 и LC3, подтвердили активацию процесса аутофагии в 3D сфероиде МСКч по сравнению с 2D культурой. Таким образом, наши предварительные данные предполагают активацию процесса аутофагии в 3D-сфероиде МСКч, как основного механизма преодоления клеточного старения этих клеток.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 20-015-00060.

М.М. Савина^{1,2}, С.В. Пономарцев¹,
И.Н. Воропаев¹, А.Н. Томилин¹

ХАРАКТЕРИСТИКА ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ, НЕСУЩИХ АЛЬФОИДНУЮ^{ТЕТО} ИСКУССТВЕННУЮ ХРОМОСОМУ С ГЕНОМ ФАКТОРА СВЁРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ 8 (FVIII) ЧЕЛОВЕКА

¹ Институт цитологии, Санкт-Петербург, Россия

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

M.M. Savina^{1,2}, S.V. Ponomartsev¹,
I.N. Voropaev¹, A.N. Tomilin¹

CHARACTERIZING OF INDUCED PLURIPOTENT MOUSE STEM CELLS CARRYING ALPHOID^{TEO} ARTIFICIAL CHROMOSOME WITH THE HUMAN GENE OF BLOOD COAGULATION FACTOR 8 (FVIII)

¹ Institute of Cytology, St-Petersburg, Russia

² St-Petersburg State University, St-Petersburg, Russia

nagornaiay-m@mail.ru

Искусственная альфоидная^{Тето} хромосома человека (ИХЧ) представляет собой новый тип вектора для генной терапии. Созданная с помощью восходящего («bottom-up») подхода, она представляет собой мультимеризованный α -сателлитный димер ДНК, один из мономеров которого содержит сайт связывания белка CENP-B, а второй — последовательность тетрациклинового оператора (tetO) [1]. Нами были получены мутантные по FVIII индуцированные плюрипотентные стволовые (ИПС) клетки мыши, содержащие ИХЧ с человеческим геном FVIII. С помощью тератомного теста и иммуноцитохимической окраски было показано, что полученные клетки не теряют своих плюрипотентных свойств. Также нами была проанализирована устойчивость ИХЧ в данных клетках и показана их способность экспрессировать ген FVIII.

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биомедицинские технологии: инновационные разработки» и гранта РФФИ_а № 1804-01199.

Литература:

1. Nakano M., Cardinale S., Noskov V. et al. Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. *Developmental Cell.* 2008; 14:507–522

Л.А. Сафиуллина¹, Е.Д. Порохова¹,
Е.С. Мелашенко², И.К. Норкин², Е.О. Шунькин²

ВЛИЯНИЕ Т-КЛЕТОК НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК IN VITRO

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

² Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

L.A. Safiullina¹, E.D. Porokhova¹,
E.S. Melashchenko², I.K. Norkin², E.O. Shunkin²

EFFECT OF T-CELLS ON OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN VITRO

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

² Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

porohova_e@mail.ru

Известно, что регенерация системы кость/костный мозг происходит за счет взаимодействия мезенхимных стволовых клеток (МСК), гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и их потомков в составе остеобластических ниш. Т-клетки лейкозной линии Jurkat часто используются для моделирования реакции Т-лимфоцитов [1]. Целью исследования стала оценка влияния адгезированных Т-клеток линии Jurkat на остеогенную дифференцировку МСК жировой ткани человека при их сокультивировании in vitro. Клетки линии Jurkat получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). В течение 21 суток клетки культивировали в полной питательной среде α MEM без остеогенных добавок, либо с остеогенными добавками (остеосреда). Были сформированы 4 группы исследования (по 4 лунки в каждой): 1 — МСК в α MEM; 2 — МСК в остеосреде; 3 — МСК+Jurkat в α MEM; 4 — МСК+Jurkat в остеосреде. После культивирования прилипшие к пластику клетки фиксировали в парах формалина и окрашивали ализариновым красным S, подсчитывали площадь и количество участков минерализации межклеточного матрикса. Клетки в 1-й группе формировали слабо окрашенный монослой, что свидетельствует о незначительной остеогенной дифференцировке МСК. При культивировании в остеосреде отмечалось усиление дифференцировки МСК в остеобласты с формированием отдельных участков интенсивно окрашенного минерализованного матрикса. При добавлении Jurkat Т-клеток в культуру МСК удалось значительное увеличение количества и площади участков минерализации межклеточного матрикса. При этом, максимальный прирост числа (1,5 раза) и общей площади (в 36 раз) участков минерализации смешанной культуры МСК+Jurkat наблюдался в остеосреде. Таким образом, длительное сокультивирование МСК и Jurkat способствует усилению остеогенной дифференцировки МСК с образованием межклеточного костного матрикса и, по-видимому, формированию остеобластической ниши, повышающей выживаемость Jurkat Т-клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10031).

Литература:

1. Au A., Ha J., Hernandez M. et al. Nickel and vanadium metal ions induce apoptosis of T-lymphocyte Jurkat cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2006; 79: 512–521.

Д.Н. Силачев^{1,2}, В.В. Головичева^{1,3},
Т.И. Данилина¹, Ю.А. Шевцова², К.В. Горюнов²,
В.А. Бабенко^{1,2}, Е.Ю. Плотников^{1,2},
Е.А. Туровский³, В.П. Зинченко³, Д.Б. Зоров^{1,2}

**ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ
ВЕЗИКУЛ: МОЖНО ЛИ ПОСТАВИТЬ ЗНАК
РАВЕНСТВА?**

¹ Научно-исследовательский институт Физико-Химической Биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия,

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Россия

³ Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская область, Россия

D.N. Silachev^{1,2}, V.V. Golovicheva^{1,3},
T.I. Danilina¹, Yu.A. Shevtsova², K.V. Goryunov²,
V.A. Babenko^{1,2}, E.Yu. Plotnikov^{1,2},
E.A. Turovsky³, V.P. Zinchenko³, D.B. Zorov^{1,2}

**THERAPEUTIC USE OF STEM CELLS AND
EXTRACELLULAR VESICLES: IS IT POSSIBLE
TO PUT AN EQUAL SIGN?**

¹ A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

³ Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

silachevdn@genebee.msu.ru

Заболевания головного мозга, связанные с органическим повреждением нервной ткани, занимают одно из первых мест в структуре смертности и инвалидизации населения во всем мире. В последние годы было показано, что использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) является перспективным методом лечения, способным значительно ускорить восстановление функций головного мозга после ишемического повреждения или черепно-мозговой травмы. Основным механизмом терапевтического действия ММСК многие исследователи считают межклеточную коммуникацию между ММСК и клетками микроокружения, которая реализуется паракринно через секрецию внеклеточных везикул (ВВ) или прямые межклеточные контакты. Однако, вклад каждого механизма в реализацию нейропротекторных эффектов ММСК в достаточной степени не изучен. С целью изучения вклада каждого механизма межклеточной коммуникации в нейропротекторное действие ММСК, нами проводились исследования роли межклеточных контактов и ВВ в модельных системах повреждения головного мозга *in vivo* и *in vitro*.

Было показано, что в условиях *in vitro* ММСК могут образовывать межклеточные контакты по типу туннелирующих нанотрубок между нейронами и астроцитами, через которые осуществляется двусторонняя межклеточная передача цитоплазматического содержимого и однонаправленная передача митохондрий от ММСК к клеткам микроокружения. Сверхэкспрессия белка Miro1, ответственного за межклеточный транспорт митохондрий, усиливала передачу митохондрий из ММСК и нейропротекторное действие ММСК *in vivo*,

тогда как препятствие образованию межклеточных контактов между ММСК и клетками микроокружения снижало терапевтические эффекты ММСК. Другим терапевтическим подходом являлось введение животным ВВ, полученных из кондиционированной среды ММСК. ВВ выделяли методом дифференциального центрифугирования, количественный анализ проводили методом НТА. Интраназальная инстиллязия ВВ достоверно восстанавливала сенсомоторные функции у животных после ЧМТ, также как ММСК. ВВ защищали клетки гиппокампа от гибели после моделирования условий ишемии *in vitro* через снижение $[Ca^{2+}]_i$ во время фазы глобального роста цитозольного кальция. ВВ также индуцировали аберрантную осцилляцию $[Ca^{2+}]_i$ в астроцитах через 30 минут инкубирования в нормальных условиях, что может являться одним из механизмов выработки ишемической толерантности. ВВ значительно ускорили рост нейритов в ходе развития нейроглиальной сети гиппокампа *in vitro* в течение первых 7 суток культивирования.

Можно заключить, что ММСК оказывают нейропротекторное действие через несколько основных механизмов: прямые межклеточные контакты, а также через внеклеточные везикулы (паракринный механизм). ВВ ММСК обладают нейропротекторным действием и при определенных терапевтических схемах возможно достичь терапевтического эффекта, равного эффекту от ММСК, за счет увеличения количества ВВ и кратности введения животным.

Работа поддержана грантом РФФИ 20-015-00414.

Т.Ю. Старкова¹, С.В. Пономарцев¹,
Е.В. Чихиржина¹, А.Н. Томилин^{1,2}

**РОЛЬ НЕГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА
HMGB1 И HMGB2 В ПОДДЕРЖАНИИ
ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ
И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ**

¹ Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

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

T.Y. Starkova¹, S.V. Ponomartsev¹,
E.V. Chikhirzhina¹, A.N. Tomilin^{1,2}

**THE ROLE OF THE CHROMATIN PROTEINS
HMGB1 AND HMGB2 IN DIFFERENTIATION
OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS**

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

t.starkova@incras.ru

Главной целью исследования является выявление роли негистоновых хромосомных белков Hmgb1 и Hmgb2 в формировании структурно-функциональных параметров хроматина эмбриональных стволовых клеток мыши.

С помощью CRISPR/Cas9-технологии мы получили и охарактеризовали линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), нокаутные по Hmgb1, Hmgb2 и Hmgb1/Hmgb2 одновременно, исследовали как совместную, так и индивидуальную роль данных белков в процессе самоподдержания и дифференцировки ЭСК. Мы показали,

что нокаутные по *HmgB1*, *HmgB2* и *HmgB1/HmgB2* ЭСК жизнеспособны и их фенотип существенно не отличается от фенотипа контрольных клеток. Далее мы провели оценку экспрессии маркеров плюрипотентности и установили, что при нокауте гена *HmgB2* происходит существенное повышение уровня экспрессии *Ost4*. Анализ гистологических срезов тератом, полученных путем подкожной инъекции суспензии ЭСК нокаутных по *HmgB1*, *HmgB2* и *HmgB1/HmgB2* мышам линии NUDE, не выявил существенных отклонений — во всех случаях присутствовали клетки трех типов зародышевых листков. В то же время мы обнаружили, что на раннем этапе *in vitro* дифференцировки ЭСК в эпибластные стволовые клетки (ЭпиСК) в случае нокаута гена *HmgB2* наблюдается существенная клеточная гибель, что указывает на важную роль *HmgB2* в переходе между наивным и праймированным состояниями плюрипотентности, характерными для клеток эпибласта до и после имплантации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 18-04-01199_a).

А.К. Степанюгина, Н.Г. Плехова
ПРООКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ
ПЕРСПЕКТИВНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ
ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ
ХЛОРОФИЛЛА ОХУ

Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

A.K. Stepanyugina, N.G. Plekhova
PROOXIDANT ACTION OF A PROSPECTIVE
DRUG FOR PHOTODYNAMIC THERAPY
CHLOROPHYLL OXY

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

stepanyugina@gmail.com

Фотодинамическая терапия (ФДТ) широко используется в онкологии для селективного разрушения опухолей. Данный вид терапии является способом специфического уничтожения злокачественных тканей. Синтез и изучение свойств новых фотосенсибилизаторов (далее ФС) является центральным направлением в повышении эффективности ФДТ. Механизм ФДТ реализуется за счет накопления в клетке активных форм кислорода, количество которых зависит от прооксидантной активности препарата.

Цель исследования: в сравнительном аспекте оценить прооксидантную активность ФС — хлорофиллина, Хлорофилла ОХУ и хлорина Е6.

Материалы и методы. Изучалась прооксидантная активность в отношении первичной культуры нейтрофилов биологически активной добавки «Хлорофилл ОХУ» (активная субстанция хлорофиллин 340 мг в 100 мл) и ее компонентов: хлорофиллина (водорастворимая медьсодержащая натриевая соль хлорофилла), мальтодекстрина, содержащий сорбат калия на основе очищенной воды. Для сравнения эффекта действия на клетки использовали хлорин Е6, выделенный их сине-зеленой водоросли спируллины. Оценка морфофункционального состояния клеток проводилась с помощью проточной цитометрии (MACS Quant TM Analyzer 10) и флуоресцентной микроскопии.

Результаты: анализ накопления ФС в цитоплазме клеток при длине волны возбуждения 620 нм показал,

что наибольшее количество нейтрофилов, флуоресцирующих в указанном диапазоне, отмечалось после 2-х ч контакта с Хлорофиллом ОХУ и составило 25,4%, тогда как после контакта с хлорином Е6 — 17,6%. При изучении содержания дигидрородамина 123 в клетках (специфический зонд для определения окислительного метаболизма в нейтрофилах) под влиянием фотосенсибилизаторов установлено, что наибольшее количество позитивных клеток определялось после контакта с хлорофиллином.

Вывод. По результатам исследования можно заключить что ОХУ-хлорофилл демонстрирует более выраженную прооксидантную активность по сравнению с хлорином Е6.

Р.Е. Ушаков, М.А. Витте,
Е.В. Скворцова, Е.Б. Бурова

ХОНДРОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА
МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА КАК РЕЗУЛЬТАТ
НОКАУТА IGFBP3

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

R.E. Ushakov, M.A. Vitte,
E.V. Skvortsova, E.B. Burova

CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN
ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STEM CELLS
AS A RESULT OF IGFBP3 KNOCKOUT

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

uszakow@yandex.ru

Члены семейства белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста (IGFBPs), с функциональной точки зрения первоначально были охарактеризованы как регуляторы доставки IGF в ткани. Как выяснилось позднее, помимо IGF-зависимых эффектов, IGFBPs проявляют и IGF-независимые эффекты, связываясь с рядом других лигандов. Объект нашего исследования, белок IGFBP3, в зависимости от клеточного контекста, способен стимулировать клеточную пролиферацию или, напротив, оказывать проапоптотическое действие: IGFBP3 может служить маркером как благоприятного, так и плохого прогноза при ряде заболеваний — онкологических, сердечно-сосудистых и др.

Недавно нами было показано, что в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках человека (эмСК) в условиях окислительного стресса наблюдается гиперэкспрессия IGFBP3 [1]. В свою очередь, секретированный IGFBP3 играет существенную роль в распространении старения в культуре эмСК [2]. В целях дальнейшего исследования функций IGFBP3 как паракринного медиатора клеточного старения мы получили IGFBP3-нокаутные эмСК с помощью технологии CRISPR/Cas9. Нокаут был подтвержден методом иммуноблоттинга. Неожиданно для нас, нокаутные клетки изменили свою морфологию, начали агрегировать и образовывать колонии, заметные на культуральном пластике невооруженным глазом. Иммунофенотипирование выявило отсутствие экспрессии характерных для эмСК поверхностных маркеров CD44, CD73, CD90 и существенное понижение CD105, что свидетельствует об утрате нокаутными клетками стволовости. Положительное окрашивание клеточных агрегатов альциановым синим и экспрессия нокаутными клетками коллагена II типа предполагают, что нокаутные клетки претерпели хондрогенную дифференцировку.

Вовлеченность IGFBP3 в процесс хондрогенной дифференцировки МСК была показана в ряде работ.

Так, IGFBP3 ингибирует дифференцировку МСК в хондроциты, являясь антагонистом TGF- β , одного из основных индукторов хондрогенной дифференцировки. Кроме того, существует линия хондрогениторов, выделенных из МСК крысы, не экспрессирующих IGFBP3 и спонтанно превращающихся в хондроциты *in vitro*. Гибель хондроцитов при остеоартрите ассоциирована с гиперэкспрессией IGFBP3. Основываясь на литературных данных и на наших результатах, мы полагаем, что IGFBP3 может принимать участие в регуляции хондрогенной дифференцировки эМСК.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-04-00598

Литература:

1. Griukova A, Deryabin P, Shatrova A. et al. Molecular basis of senescence transmitting in the population of human endometrial stromal cells. *Aging* (Albany NY). 2019; 11:9912–9931.
2. Vassilieva I, Kosheverova V, Vitte M. et al. Paracrine senescence of human endometrial mesenchymal stem cells: a role for the insulin-like growth factor binding protein 3. *Aging* (Albany NY). 2020; 12:1987–2004.

Д.А. Федотов¹, Е.С. Новоселецкая^{1,2},
Г.Д. Сагарадзе², Н.А. Басалова^{1,2},
Н.А. Александровская^{1,2},
О.А. Григорьева², А.Ю. Ефименко^{1,2}

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС КАК КОМПОНЕНТ АССОЦИИРОВАННОГО СО СТАРЕНИЕМ СЕКРЕТОРНОГО ФЕНОТИПА СЕНЕСЦЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

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

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

D.A. Fedotov¹, E.S. Novoseletskaia^{1,2},
G.D. Sagaradze², N.A. Basalova^{1,2},
N.A. Alexandrushkina^{1,2}, O.A. Grigorieva²,
A.Yu. Efimenko^{1,2}

EXTRACELLULAR MATRIX AS A COMPONENT OF SENESCENT-ASSOCIATED SECRETORY PHENOTYPE OF SENESCENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS

¹ Faculty of Fundamental medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute for regenerative medicine, Medical research and education center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

fedotovdanilaa@mail.ru

Решающую роль в процессах старения играет изменение секрета накапливающихся в тканях сенесцентных клеток, который характеризуется высоким уровнем провоспалительных цитокинов, дисбалансом факторов роста, протеаз и их ингибиторов (senescence-associated secretory phenotype — SASP). Существенный вклад в развитие старения тканей вносит дисфункция тканеспецифичных стволовых клеток и их микроокружения (ниши). В поддержании гомеостаза микроокружения стволовых клеток участвуют не только растворимые факторы, но и внеклеточный матрикс (ВКМ). Ряд работ свидетельствует о критической роли ВКМ в патогенезе возраст-ассоциированных

заболеваний. Однако участие секретируемого сенесцентными клетками ВКМ в формировании просенесцентного микроокружения остается малоизученным. Целью нашей работы было изучение ВКМ, продуцируемого сенесцентными мезенхимными стромальными клетками (МСК), являющимися важным компонентом ниши стволовых клеток.

МСК выделяли из жировой ткани доноров двух возрастных групп: до 50 лет и старше 65 лет (n=20). В качестве маркеров сенесцентных клеток проводили оценку пролиферативной активности клеток, экспрессии ингибиторов клеточного цикла (p21), длины теломера, активности бета-галактозидазы (б-гал), содержания компонентов SASP в секретоме МСК. По результатам измерений определили пороговый возраст пациентов, в клетках которых наблюдали повышенный уровень этих маркеров. Эти клетки использованы для получения ВКМ с помощью децеллюляризации клеточных пластов из МСК (дВКМ). Структура и состав дВКМ были оценены с помощью иммуногистохимического анализа основных компонентов ВКМ (коллаген I, III, IV типов, фибронектин, ламинин). Оценка эффективности децеллюляризации матрикса была проведена с помощью количественного анализа на содержание остаточной ДНК, а также по окрашиванию DAPI.

Средний возраст пациентов, в клетках которых уровень маркеров старения был повышен больше чем на 80% относительно клеток молодых доноров, составил 70 лет. МСК отобранных пациентов формировали клеточные пласты, в которых позитивно окрашенные на б-гал клетки располагались преимущественно в локусах повышенной плотности. Полученный при децеллюляризации этих клеточных пластов дВКМ содержал основные компоненты ВКМ с сохраненным паттерном компарментализации. Эффективность децеллюляризации составила 98,78%.

Таким образом, нами был успешно получен ВКМ, секретируемый сенесцентными МСК человека, который может быть важным компонентом SASP этих клеток и использован для дальнейших исследований.

Исследование выполнено в рамках госзадания МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова (оценка уровня биомаркеров сенесцентных клеток) и при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-29-04172, работа по получению и исследованию компонентов секрета МСК).

Г.А. Фурса^{1,2}, А.Д. Воронова¹, О.В. Степанова^{1,3},
Е.К. Карсунцева^{1,2}, М.П. Валихов^{1,3}, А.В. Чадин¹,
Д.А. Вишневский¹, И.В. Решетов⁴, В.П. Чехонин¹

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ АДГЕЗИВНОЙ КУЛЬТУРЫ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ОБНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ КРЫС ДЛЯ ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ КИСТ СПИННОГО МОЗГА

¹ Отдел фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ ФМИЦПН им. В.П. Сербского Минздрава РФ, Москва, Россия

² Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Отдел клинической диагностики ФГБУ НМИЦ Кардиологии Минздрава РФ, Москва, Россия

⁴ Университетская клиническая больница № 1 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

G.A. Fursa^{1,2}, A.D. Voronova¹, O.V. Stepanova^{1,3},
E.K. Karsuntseva^{1,2}, M.P. Valikhov^{1,3}, A.V. Chadin¹,
D.A. Vishnevsky¹, I.V. Reshetov⁴, V.P. Chekhonin¹

**METHODOLOGICAL FEATURES OF OBTAINING
OF ADHESIVE NEURAL STEM PROGENITOR
CELLS CULTURE FROM RAT OLFATORY
MUCOSA FOR THE TREATMENT
OF EXPERIMENTAL SPINAL CYSTS**

¹ Department of Basic and Applied Neurobiology,
V.P. Serbsky National Medical Research Center for
Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia

² Department of Biology, Moscow State University,
Moscow, Russia

³ Department of Neurohumoral and Immunological
Research, National Medical Research Center
of Cardiology, Moscow, Russia

⁴ Department of Plastic Surgery, I.M. Sechenov First
Moscow State Medical University, Moscow, Russia

gregorii.fursa@gmail.com

Терапия посттравматических кист спинного мозга — крайне актуальная проблема современной медицины, поскольку на сегодняшний день нет эффективных методов их лечения. Реабилитация пациентов занимает несколько лет, но полное восстановление сенсомоторных функций происходит редко из-за гибели большого числа нейронов в области травмы. Перспективной стратегией лечения является клеточная терапия с применением нейральных стволовых/прогениторных клеток (НСПК) из обонятельной выстилки носа. Для увеличения эффективности клеточной трансплантации обязательна оценка чистоты культуры и количества клеток вводимого препарата, которая невозможна при использовании нейросфер. Целью данной работы является разработка оптимального протокола получения адгезивной культуры НСПК из обонятельной выстилки крыс для терапии экспериментальных кист спинного мозга.

Для получения НСПК были использованы образцы обонятельной выстилки крыс линии Wistar (n=30). Клетки выращивали на матриксах фибронектин и ламинин в бессывороточных средах DMEM:F12 и нейробазальной. Клетки нейральной дифференцировки были выявлены по маркерам нестин и βIII-тубулин методом иммунофлуоресценции. Количество клеток подсчитывали по количеству окрашенных DAPI ядер. Визуализация кист проводилась методом МРТ. Полученные НСПК трансплантировали в посттравматические кисты спинного мозга крыс (n=7).

Было показано, что пролиферация клеток была максимальной при культивировании на обоих матриксах в нейробазальной среде. При культивировании на фибронектине в нейробазальной среде процентное содержание нестин-положительных клеток было максимально (52,22%) по сравнению с другими условиями культивирования. Наибольшее процентное содержание βIII-тубулин-положительных клеток было выявлено в культурах, растущих на фибронектине в нейробазальной среде и в DMEM:F12 (79,11% и 83,52% соответственно). Нами впервые было показано, что при трансплантации 200 тысяч НСПК в кисты наблюдалась положительная динамика восстановления двигательной активности задних конечностей по шкале BBB в течение всех 4-х недель по сравнению с контрольной группой (n=9), а также был выявлен нейропротективный эффект на 1-ой неделе после трансплантации.

Культивирование в нейробазальной среде на фибронектине позволяет получить адгезивную культуру, максимально обогащенную НСПК в достаточном для дальнейшей трансплантации количестве. Клетки обонятельной

выстилки крайне перспективны для персонализированной медицины будущего. Они могут быть получены от пациента с травмой спинного мозга и после культивирования и направленной нейрональной дифференцировки, будучи тканеспецифичными и аутологичными, трансплантированы тому же самому пациенту. При этом получение обонятельной выстилки является процедурой доступной и безопасной для пациента.

Работа выполнена при поддержке РФ: грант № 17-15-01133.

Т.С. Хабалова, Г.В. Селедцова

**ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
МИКРОВЕЗИКУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ
ИЗ РАЗНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ,
НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
В МОДЕЛЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ И ОСТРОЙ
ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ МЫШЕЙ**

Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии
(НИИФКИ), г. Новосибирск, Россия

T.S. Khabalova, G.V. Seledtsova

**THE EFFECTS OF MICROVESICLES WHICH
ARE OBTAINED FROM DIFFERENT CELL LINES
ON MORPHOLOGICAL PARAMETERS IN MICE
WITH CHRONIC AND ACUTE RENAL FAILURE**

Federal State Budgetary Scientific Institution Research
Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
Novosibirsk, Russia

khabalovat@gmail.com

Микровезикулы активно изучаются в качестве потенциальной бесклеточной терапии множеств заболеваний, в том числе и в регенеративной медицине. В ходе исследований было установлено, что микровезикулы способны к переносу микроРНК, мРНК, белков, а также участвуют во множестве процессов за счет вовлеченности в межклеточный контакт. Одним из типов изучаемых клеток в регенеративной медицине являются мезенхимальные стволовые клетки, показавшие отсутствие дифференцировки при трансплантации их в поврежденные почки. Целью нашего исследования было сравнить микровезикулы, полученные из разных клеточных линий, на морфологическое состояние почек в моделях как хронической, так и острой почечной недостаточности.

Материалы и методы

Модели острой и хронической почечной недостаточности были индуцированы введением 50% глицерола мышам линии СВА возрастом 4–5 месяцев.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были получены из костного мозга сингенных мышей. Линии L929, V16, LLC были размножены по программе. Все полученные клетки были культивированы при 37°C в CO2 инкубаторе. Микровезикулы были получены последовательным ультрацентрифугированием.

Образцы почек были взяты на 4 и 11 сутки после введения микровезикул. Почки были выделены и помещены в 4% раствор формальдегида. Применены три метода окраски: гематоксилин и эозин, сириус красный, окраска по Маллори.

Результаты

При острой почечной недостаточности (ОПН) на 11 сутки наибольший регенеративный эффект

продемонстрировали микровезикулы (МВ), полученные из МСК. Дистрофических изменений в корковом веществе не было обнаружено, по сравнению с той же группой на 4 сутки. При хронической почечной недостаточности (ХПН) дистрофии клубочек почек не было зафиксировано при введении микровезикул, полученных из опухолевых линий В16 и LLC по сравнению с группой контроля с ХПН.

Таким образом про-регенераторное действие микровезикул не является специфичным для мезенхимальных стволовых клеток.

Работа была проведена при поддержке грант РФФИ 19-315-90056.

А.С. Чабина^{1,2}, И.В. Воронкина¹, Ю.А. Нащеккина¹
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АРГИНИНОВОЙ
МОДИФИКАЦИИ ПОЛИ-ε-
КАПРОЛАКТОНОВЫХ ПЛЕНОК НА СИНТЕЗ
БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ
КЛЕТКАМИ

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

A.S. Chabina^{1,2}, I.V. Voronkina¹, Y.A. Nashchekina¹
EFFECTS OF ARGININE MODIFICATION
OF POLY-ε-CAPROLACTONE FILMS ON THE
SYNTHESIS OF INTRACELLULAR MATRIX
PROTEINS BY MESENCHYMAL STEM CELLS

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

Chabina-alina@yandex.ru

Поли-ε-капролактон (ПКЛ) активно применяется в качестве основы тканеинженерных конструкций. Однако ввиду гидрофобности материала и отсутствия поверхностного заряда клетки плохо адгезируют на данных полимер. Следовательно, материал требует дополнительных улучшений, например, модификации его поверхности [1].

Одной из возможных модификаций является обработка природной аминокислотой — аргинином. Таким образом, целью данного исследования стало изучить взаимодействие мезенхимальных стромальных клеток (МСК) с модифицированной аргинином полимерной матрицей, а именно на синтез клетками белков внутриклеточного матрикса.

Матрицы получали методом полива из раствора ПКЛ в хлороформе, затем обрабатывали в 0,5М, 0,25М, 0,1М водном растворе аргинина и в 0,25М, 0,1М водно-спиртовом растворе аргинина (соотношение воды к спирту (ИПС) 3:1), в течение 60 минут при T=40 °C и при комнатной температуре в течении суток, а после промывали в дистиллированной воде 10 минут.

Для оценки количества синтезированных клетками белков предварительно были подготовлены пробы на основе аликвот кондиционированной среды после культивирования МСК в течение 1 суток, которую смешивали с буфером для проб [2]. При анализе белков, синтезированных клетками на матрицах, матрицы после культивирования клеток обрабатывали буфером для проб. В качестве положительного контроля использовалось стекло, а отрицательного — необработанный ПКЛ.

Было выявлено, что количество плазменного фибронектина уменьшается по сравнению с отрицательным

контролем, особенно заметно для плёнок, обработанных в течение суток или спиртовыми растворами. Количество фибронектина в лизате клеток на плёнках, обработанных в течение часа, значительно (в 2–3 раза) превышает отрицательный контроль, когда для плёнок, обработанных в течение суток, его значение сравнимо с контролем или меньше (для 0,5М водного раствора аргинина и спиртовых растворов аргинина).

Количество коллагена 1 типа значительно увеличивается по сравнению с контролем для всех видов обработки. Количество коллагена 4 типа в среде и лизате клеток, культивируемых на плёнках, обработанных в течение суток, меньше, чем для контроля.

Таким образом, модификация аргинином значительно влияет на синтез белков внеклеточного матрикса МСК, культивируемых на полимерных плёнках.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20-03-00400_a).

Литература:

1. Jiao Y.P., Cui F.Z. Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. *Biomedical Materials* 2007; 4 (2):24–37.
2. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680–685.

И.Н. Черненко, Н.Г. Плехова

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ КАК
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ОБЪЕКТЫ ДЛЯ
РАЗРАБОТКИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ВАКЦИНЫ

Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

I.N. Chernenko, N.G. Plekhova

DENDRITIC CELLS AS POTENTIAL OBJECTS
FOR THE DEVELOPMENT OF AN ANTIVIRAL
VACCINE

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

chernencrj2010@mail.ru

В процессе дифференцировки из гемопоэтических CD34⁺ клеток дендритные клетки (ДК) претерпевают значительные изменения: морфологические, фенотипические, функциональные, которые приводят к индукции их антигенпредставляющей функции. Эти клетки занимают ключевые позиции при формировании противовирусного иммунного ответа при вирусных инфекциях. Существует два подтипа ДК — первый, в которые вирусы легко проникают и достаточно активно размножаются и второй, с помощью которых передается антиген остальным иммунным клеткам. При исследовании хантавирусов (ХВ, возбудитель тяжелого заболевания с 20% летальным исходом, геморрагической лихорадки с почечным синдромом) была обнаружена их способность проникать и размножаться в ДК. **Цель исследования.** Изучить изменения функциональных свойств ДК при их заражении хантавирусом.

Материалы и методы. Исследование проводилось на культуре индуцированных TNF-α (Sigma) ДК, полученных из недифференцированных клеток миелоидного пула костного мозга бедренной кости морских свинок. Для заражения ДК использовался штамм Аа 60343 (ПМ-79-95) геноварианта Far East вируса Hantaan из Семейства Bunyviridae. Время контакта с ХВ составляло 60 минут, после чего

инкубация продолжалась в течение от 2 и до 96 ч. Для оценки функционального состояния ДК определяли активность ферментов (АТФ-азы, 5'-нуклеотидазы, сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), миелопероксидазы (МПО) и цитохромоксидазы (ЦХО).

Результаты. В ходе исследования была выявлена ранняя активация ДК, зараженных ХВ, на что указывало снижение концентрации АТФ-азы в клетках. Тогда как, при индукции TNF- α наблюдалась более поздняя активация ДК. Определено, что в ДК, стимулированных хантавирусом, наблюдалась также активация сукцинатдегидрогеназной системы, в то время как в ДК без воздействия вируса активировалась лактатдегидрогеназа.

Вывод. По результатам исследования можно заключить, что ХВ вызывает выраженную активацию метаболизма дендритных клеток, что указывает на их потенциальную способность реализовать антигенпредставляющую функцию.

Литература:

1. Ляпун Ирина Николаевна, Плехова Наталья Геннадьевна, Дробот Елена Игоревна. Метаболическая активность дендритных клеток при их взаимодействии с хантавирусом Здоровье. Медицинская экология. Наука 2017; 3 (70): 27–30.
2. Raftery M.J., Kraus A.A., Ulrich R., Kruger D.H., Schonrich G. Hantavirus Infection of Dendritic Cells. J. of Virology. 2002; 76(21): 10724–10733.

**М.Н. Чиркова^{1,2}, А.М. Аймалетдинов¹,
Е.Ю. Закирова¹**

ИММУНОФЕНОТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ И ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК АДИПОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЛОШАДИ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO

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

² Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, Казань, Россия

M.N. Chirkina^{1,2}, A.M. Aimaltdinov¹, E.Yu. Zakirova¹ IMMUNOPHENOTYPIC PROFILE AND DIFFERENTIATION CAPABILITIES OF ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS OF A HORSE DURING IN VITRO CULTIVATION

¹ Kazan (Volga Region) Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan, Russia

² Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, Kazan, Russia

lenahamzina@yandex.ru

Образцы подкожной жировой ткани лошади получены от здоровых доноров, проведенной с добровольного информированного согласия хозяина. Полученный образец доставляли в культуральную лабораторию, где из жировой ткани выделяли стромально-сосудистую фракцию по стандартной методике (1). Для подтверждения принадлежности полученных клеток к мезенхимальным стволовым клеткам (МСК), проводили проточную цитофлуориметрию на приборе FACS Aria III (BD, США) с использованием антител к Thy-1 (BioLegendCat. No. 328112, США), CD44 (BioLegendCat. No.103028, США) и CD34 (SantaCruz, Cat. No.7324, США), CD45 (BioLegendCat. No.304026,

США) согласно инструкциям фирм-производителей. Дифференцировку клеток (в остеогенном, адипогенном, хондрогенном направлениях) и их окрашивание проводили по описанной ранее методике (1).

Все клетки, изолированные из жировой ткани лошади, адгезировались на культуральном пластике и имели фибробластоподобную морфологию. Проточная цитометрия выявила наличие мембранных маркеров CD44 и Thy-1 и отсутствие CD34, CD45, что свидетельствует о принадлежности выделенных клеток к МСК. Положительная дифференцировка выделенных клеток лошади в адипо-, остео- и хондронаправлениях подтверждает их биологическую активность, свойственную МСК.

Таким образом, проведенные иммуноцитохимические исследования и выявленные дифференцировочные возможности подтверждают принадлежность культивируемых нами клеток лошади к пулу МСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-016-00022.

Литература:

1. Zakirova E.Y., Zhuravleva M.N., Masgutov R.F. Usmanov R.A., Rizvanov, A.A. Isolation, analysis and application of autogenic adipose derived multipotential mesenchymal stromal cells from dog for therapy pseudoarthrosis of tibial bone. Genes and Cells 2014; 9(3):70–75.
2. Zakirova E.Y., Azizova D.A., Rizvanov A.A., Khafizov R.G. Case of applying allogenic mesenchymal stem cells of adipogenic origin in veterinary dentistry. J. of Animal and Vet. Advances 2015; 14(5): 140–3.

С.Ф. Шайхулова, Ф.С. Ахатова, Е.А. Науменко, Е.Ю. Закирова, И.Д. Гурьянов, Р.Ф. Фахруллин АНАЛИЗ МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РАЗНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПОМОЩИ АТОМНО- СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

S.F. Shaykhulova, F.S. Akhatova, E.A. Naumenko, E.Yu. Zakirova, I.D. Guryanov, R.F. Fakhrullin ANALYSIS OF THE MECHANICAL CHARACTERISTICS OF STEM CELLS OF DIFFERENT ANIMALS USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Kazan Federal University, Kazan, Russia

sarbinaz2016@gmail.com

За последние десятилетия мезенхимальные стволовые клетки (МСК) стали широко изучаться благодаря особенностям их биологии, широкому клиническому потенциалу и использованию в тканевой инженерии. МСК легко культивируются, имеют потенциалы дифференцировки в различных направлениях и продуцируют множество факторов роста и цитокинов. Одним из показателей дифференцировки МСК могут служить структурно-морфологические изменения клеток. Смена морфологии и механических характеристик клеток может являться первичным показателем дифференцировки еще до того, как эти изменения можно будет идентифицировать методами специфического окрашивания и микроскопии. Также данные свойства клеток важны для оценки состояния клеточных культур в целом. Атомно-силовая микроскопия

(АСМ) обеспечивает достоверность в определении морфологических и механических характеристик клеток. На данный момент перед нами стояла задача определения структурно-морфологических характеристик МСК разного происхождения (человека и животных различных видов). В работе были использованы мезенхимальные стволовые клетки человека и животных (лошади, кошки, свиньи и крысы). При помощи атомно-силового микроскопа Dimension Icon, работающего в режиме PeakForce Tapping, были визуализированы исследуемые клеточные линии. Данный режим работы позволяет помимо топографии детектировать и механические свойства образца (адгезия и упругость). Исследуемые МСК незначительно, но всё же достоверно отличались между собой по механическим характеристикам. Самыми адгезивными клетками оказались МСК человека ($25,3 \pm 9,1$ nN), а наименее адгезивными МСК свиньи и кошки ($6,5 \pm 1,8$ и $4,6 \pm 1,5$ nN, соответственно). Мы предполагаем, что данные адгезии связаны с секрецией веществ клетками на поверхность мембраны или с более шероховатой поверхностью МСК человека по сравнению с остальными клеточными линиями. МСК лошади оказались наименее упругими по сравнению с другими (15 ± 10 МПа против 95 ± 35 МПа в среднем у всех остальных клеток). Можно предположить, что это связано с особенностями строения цитоскелета МСК лошади. В нашей последующей работе мы предполагаем определять изменения, происходящие в клетках при дифференцировке.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00353.

А.Ю. Шалаева, В.В. Козин

УЧАСТИЕ ФАКТОРОВ РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ И MAP-KИНАЗНОГО ПУТИ В КОНТРОЛЕ НАД ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ У АННЕЛИДЫ *ALITTA VIRENS*

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

A.Yu. Shalaeva, V.V. Kozin

CONTRIBUTION OF FIBROBLAST GROWTH FACTORS AND MAP-KINASE PATHWAY IN CELL PROLIFERATION CONTROL IN THE ANNELID *ALITTA VIRENS*

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

shalaeva.sasha@gmail.com

Помимо выдающихся способностей к регенерации, эррантные аннелиды обладают ещё одним особенным свойством — они сохраняют способность к терминальному росту на протяжении всей своей жизни. Оба этих процесса обеспечиваются пролиферацией мультипотентных клеток, а также их дальнейшей дифференцировкой. Для позвоночных животных показано, что молекулы факторов роста фибробластов (FGF), способны регулировать эти процессы, однако для аннелид, как и для других спиральных животных, организация и функции FGF-сигналинга остаются загадкой.

Для исследования этого вопроса на регенерирующих животных нами были выбраны 2 ингибитора: SU5402, действующий на рецептор FGF, и UO126, влияющий на каскад MAP-киназ. После воздействия ингибиторами производилась инкубация животных в растворе EdU, который метит ядра в S-фазе, обработка антителами к фосфогистону H3, выявляющими клетки в митозе, и окраска DAPI. Если инкубация в ингибиторах производилась на протяжении 7 дней, начиная с момента ампутации, наблюдалось полное угнетение пролиферации и, как следствие, отсутствие бластемы и регенерационной почки. При стандартном мечении EdU включение предшественника если и происходило, то не более чем в десятке клеток, в то время как в норме на этих сроках насчитывается порядка нескольких тысяч клеток в S-фазе. В экспериментальных образцах также не было отмечено митотических картин, что подтверждает ключевую роль FGF в активации клеточной пролиферации в ответ на повреждение. В случае инкубации в ингибиторах на более поздних стадиях (с 4 до 6 дней после ампутации, дпа) наблюдался менее выраженный эффект: отмечалось угнетение пролиферации, но без полного её подавления. При более длительном нахождении в ингибиторах (с 2 до 4 или 6 дпа) также не наблюдалось полного подавления клеточных делений, но было отмечено нарушение морфологии регенерационной почки, её нервной и мышечной систем. Применение различных концентраций SU5402 выявило, что ингибирование пролиферации и роста регенерата имеет дозозависимый и обратимый эффект.

Таким образом, мы впервые показали для аннелид, что на самых ранних этапах регенерации именно FGF-сигналинг активирует вступление клеток в митоз, однако на более поздних стадиях он не играет столь значительной роли. Помимо этого, молекулы FGF могут участвовать в индукции клеточных источников регенерации и дифференцировке, что требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена на базе морской биологической станции СПбГУ (УНБ «Беломорская»), РЦ ММ и РЦ РМиКТ СПбГУ при поддержке грантов РФФИ № 17-14-01089 (анализ морфогенезов) и РФФИ № 20-34-70158 (анализ клеточных источников регенерации).

М.М. Шаматова^{1,2}, А.В. Сударикова¹, Ю.А. Негуляев^{1,2}

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭЛЕКТРОВОЗБУДИМЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ K562 И МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

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

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

M.M. Shamatoeva^{1,2}, A.V. Sudarikova¹, Yu.A. Negulyaev^{1,2}

FUNCTIONAL ACTIVITY OF VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNELS IN K562 CELL LINE AND HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS

¹ *Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia*

² *St. Petersburg Polytechnic University of Peter the Great, Saint-Petersburg, Russia*

Shamatoeva.m.m@gmail.com

Потенциал-управляемые натриевые каналы (Nav) характерны для возбудимых клеток. Их активация,

вызванная деполяризацией мембраны, обеспечивает развитие потенциала действия в нейронах и мышечных клетках. Тем не менее, в невозбудимых клетках также могут экспрессироваться Nav[1–3]. Предполагается что эти каналы могут быть вовлечены в регуляцию пролиферации, миграции, эндоцитоза и других свойств клеток, не имеющих прямого отношения к канонической роли электровозбудимых натриевых каналов.

Цель работы заключалась в исследовании функциональной экспрессии Nav в клетках лейкемии K562 и в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках человека (эМСК). В задачи работы входила проверка предположений об участии Nav в регуляции клеточной подвижности эМСК.

В экспериментах whole-cell метода patch-clamp на клетках K562 и эМСК были зарегистрированы ионные токи, активируемые деполяризацией мембраны и обладающие кинетикой, характерной для электровозбудимых натриевых каналов. Для регистрации активности каналов использовали протокол со скачкообразным изменением потенциала в диапазоне от -100 до +100 мВ с приращением 10 мВ, поддерживаемый потенциал на мембране -100 мВ. Потенциал-активируемые натриевые токи наблюдали в 76% для клеток K562 (n=21) и в 88% опытов для эМСК (n=25). Они блокировались специфическим ингибитором ТТХ (1 мкМ), это служит доказательством того, что данные каналы являются Nav. Функциональная экспрессия каналов была также подтверждена с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания специфическими антителами к PAN-Nav. Вовлечение каналов в миграционную способность эМСК было исследовано методом «заращения раны» с использованием прижизненной микроскопии. Достоверных изменений скорости заращения раны в присутствии блокатора ТТХ в среде культивирования по сравнению с контрольными условиями обнаружено не было.

Таким образом, с помощью иммунофлуоресцентного и электрофизиологического методов нами была продемонстрирована экспрессия и функциональная активность электровозбудимых натриевых каналов в плазматической мембране клеток K562 и эМСК. Вопрос о функциональной нагрузке обнаруженных каналов остается открытым.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 19-015-00211 (для А.В. Судариковой) и РНФ № 18-15-00106.

Литература:

1. Black J.A., Liu S., Waxman S.G. Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia*. 2009; 57:1072–81
2. Chopra S.S., Stroud D.M., Watanabe H. et al. Voltage-gated sodium channels are required for heart development in zebrafish. *Circ. Res.* 2010; 106:1342–50
3. Kis-Toth K., Hajdu P., Bacskai. et al. Voltage-gated sodium channel Nav1.7 maintains the membrane potential and regulates the activation and chemokine-induced migration of a monocyte-derived dendritic cell subset. *J. Immunol.* 2011; 187: 1273–80

О.О. Шошина^{1,2}, П.М. Кожин^{1,2},
А.Л. Русанов¹, Н.Г. Лузгина¹

ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА РАЗЛИЧНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПОЛЯРИЗАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

¹ ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия

² ООО НПО «Перспектива», Новосибирск, Россия

O.O. Shoshina^{1,2}, P.M. Kozhin^{1,2}, A.L. Rusanov¹,
N.G. Luzgina¹

PRIMARY ASSESSMENT OF VARIOUS POLARIZATION PARAMETERS OF MESENCHYMAL STEM CELLS ISOLATED FROM ADIPOSE TISSUE

¹ Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

² RMA "Perspektiva", Novosibirsk, Russia

lesyash145@gmail.com

В последние годы активно изучается возможность использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в клеточной терапии ряда патологических состояний. Однако существует проблема широкой донорской вариативности фенотипических характеристик первичного пула клеток. Для решения проблемы унификации клеток Waterman R. S. и соавторами в 2010 году была предложена концепция, согласно которой МСК, подобно макрофагам, способны к поляризации посредством передачи сигналов с различных Toll-рецепторов (TLR) в два гомогенных фенотипа, которые были классифицированы авторами как МСК1 и МСК2, аналогично номенклатуре поляризованных макрофагов [1]. Однако используемые различными группами исследователей протоколы поляризации МСК отличаются параметрами активации клеток, а именно временем и концентрацией лигандов TLR, а также источниками и условиями культивирования МСК, что затрудняет изучение биологии поляризованных МСК.

В рамках настоящего исследования была проведена первичная оценка параметров поляризации МСК жировой ткани. В качестве агонистов для TLR4 и TLR3 были использованы ЛПС в концентрациях 10, 50, 250 нг/мл и полиинозиновая: полицитидиловая кислота (поли(I:C)) в концентрациях 1, 5, 25 мкг/мл, соответственно. Агонисты TLR добавляли в свежую питательную среду и инкубировали с клетками в течение 1, 3 и 24 часов. Иммунофенотипическое исследование МСК методом проточной цитофлуориметрии подтвердило сохранение экспрессии основных маркеров МСК — CD73, CD105 и CD90, при максимальных параметрах воздействия лигандов на клетки. Охарактеризовано изменение экспрессии TLR в различных условиях их стимуляции использованными агонистами. Проведено исследование миграционной и пролиферативной активности поляризованных клеток. Охарактеризованы особенности состава кондиционных сред МСК1 и МСК2 (методом ИФА). Кроме того, отмечены различия влияния кондиционных сред МСК1 и МСК2, собранных в течение 48 ч после активации, на миграционную и пролиферативную активность первичной культуры фибробластов кожи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 05.604.21.0219, Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60419X0219).

Литература:

4. Waterman R. S. et al. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS one* 2010; 5(4): e10088.

12 ОКТЯБРЯ 2020

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Е.С. Авдеева¹, Т.Е. Пылаев¹, Ю.М. Ефремов²,
А.А. Антошин^{2, 4}, П.С. Тимашев^{2, 3, 4}, Н.Г. Хлебцов^{1, 5}

МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК HELA ПРИ ЛАЗЕРНОЙ ТРАНСФЕКЦИИ НА СЛОЯХ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

² Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

³ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ Институт фотонных технологий ФГУ «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, Троицк, Россия

⁵ Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

E.S. Avdeeva¹, T.E. Pylaev¹,
Y.M. Efremov², A.A. Antoshin^{2, 4},
P.S. Timashev^{2, 3, 4}, N.G. Khlebtsov^{1, 3}

MECHANICAL PROPERTIES OF HELA CELLS TRANSFECTED BY NIR IRRADIATION ON AU NANOPARTICLES LAYERS

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

² Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovskiy University), Moscow, Russia

³ N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ Institute of Photon Technologies of Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics" of Russian Academy of Sciences, Troitsk, Russia

⁵ Saratov State University, Saratov, Russia

avdeeva_e@ibppm.ru

Современные методы внутриклеточной доставки основаны на использовании вирусных и безвирусных систем, химических агентов и наноматериалов, а также физических воздействий. В качестве альтернативы хорошо известным методам микроинъекции, электропорации, ультразвукового воздействия, разрабатываются системы с применением лазерного облучения (оптопорации) [1]. Разрабатываемые системы должны быть детально изучены для достижения максимальных качественных и количественных показателей. Открытыми до сих пор являются вопросы о реакции клеток в ответ на вызываемые облучением не повреждающие изменения целостности липидного бислоя мембран. Для решения традиционно используют лазерную сканирующую (конфокальную) световую и электронную микроскопию, однако они достаточно трудоемки и имеют ограничения прижизненного исследования *in situ*. Современные возможности

атомно-силовой (зондовой) микроскопии (АСМ) сочетают в себе разрешающую способность электронной микроскопии и возможность неинвазивной для живых клеток съемки [2]. Данная работа посвящена изучению механических свойств клеток HeLa при оптопорации разработанной нами ранее системой на слоях золотых наночастиц [3]. Целью работы было изучение клеточного ответа при воздействии лазерного облучения на наночастицы золота, плазмонных «горячих точек», способствующих пермеабиллизации мембраны и облегчающих доставку непенетрирующих агентов (пропидий иодида и плазмидных ДНК). Основными регистрируемыми параметрами при АСМ-сканировании облученных и необлученных клеток был модуль Юнга и топография клеточной поверхности. Полный цикл клетки от момента облучения до полного восстановления целостности мембраны, составлял около 30 ч (при использовании непрерывного лазера) и 5 ч (для импульсного лазера), и хорошо коррелировал с относительным изменением модуля Юнга в течение всего эксперимента. Таким образом, метод АСМ оказался удобным и информативным инструментом для прижизненного наблюдения за животными клетками при оптопорации на плазмонных платформах. Полученные данные и оригинальные методические подходы могут быть использованы в аналогичных работах по изучению морфофункционального состояния монослоя клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (получение слоев наночастиц в рамках проекта № 18-14-00016, эксперименты по оптопорации клеток в рамках проекта № 17-74-10090).

Литература:

1. Stewart M.P., Langer R., Jensen K.F. Intracellular delivery by membrane disruption: mechanisms, strategies, and concepts. *Chem. Rev.* 2018; 118(16): 7409–7531.
2. Efremov Y.M. et al. Viscoelastic mapping of cells based on Fast Force Volume and PeakForce Tapping. *Soft Matter.* 2019; 15: 5455–5463.
3. Pylaev T. et al. A novel cell transfection platform based on laser optoporation mediated by Au nanostar layers. *Journal of Biophotonics.* 2019; 12: e201800166.

**А.Д. Акименкова¹, А.И. Марахова¹
ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СИНТЕЗ
НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА С ПОМОЩЬЮ
ЭКСТАКТОВ РАСТЕНИЙ**

¹ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

**A.D. Akimenkova¹, A.I. Marahova¹
FACTORS INFLUENCING THE SYNTHESIS
OF SILVER NANOPARTICLES USING PLANT
EXTRACTS**

¹ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

akimenkova.alexandra@yandex.ru

Металлические наночастицы активно применяют в биомедицине. Особое внимание среди наночастиц металлов оказывается серебру, благодаря его широкому спектру бактерицидной активности и способности координировать действия с различными лигандами и макромолекулами в микробной клетке. Одним из биологических методов получения наночастиц серебра является синтез с помощью экстрактов растений. При биологическом синтезе металлических наночастиц есть ряд контролируемых факторов, участвующих в нуклеации и последующем образовании стабилизированных наночастиц: pH, концентрация реагента, время реакции, температура. При синтезе наночастиц серебра, было получено большее количество синтезируемых частиц с увеличением концентрации экстракта и при более высоких значениях pH. Форма наночастиц при таких значениях имела тенденцию становиться сферической. Концентрация активных биомолекул, обнаруженных в растительных экстрактах, может существенно влиять на образование металлических наночастиц. Установлено, что варьирование концентрации выдержки листьев *Cinnamomum camphora* в реакционной среде смогло значительно повлиять на форму синтезируемых наночастиц серебра. Когда увеличивали концентрацию хлорауровой кислоты, форма наночастиц изменилась с треугольной на сферическую. Исследование также показало, что карбонильные соединения, присутствующие в экстракте, способствовали увеличению роста частиц. В эксперименте на влияние времени реакции для получения наночастиц серебра был использован экстракт листьев *Azadirachta indica* и нитрат серебра. Время реакции было изменено с 30 мин на 4 ч для получения изменения размера частиц в диапазоне от 10 до 35 нм. Было установлено, что температура является важным фактором в определении размера, формы и выхода наночастиц. Синтез наночастиц серебра при температуре реакции 25 °С с помощью экстракта кожуры цитрусовых происходит с образованием наночастиц средним размером около 35 нм. Когда температура реакции была повышена до 60 °С, средний размер частиц уменьшился до 10 нм. Наночастицы, синтезированные с помощью экстрактов растений, обладают потенциалом для широкого использования в современных медицинских процедурах. Но существует необходимость в дополнительных исследованиях, чтобы оценить фактическую зависимость и полностью использовать синтез металлических наночастиц с помощью биологических объектов.

Литература:

1. Datkhile K. D., Durgawale, P. P., Patil M.N. Biogenic silver nanoparticles are equally Cytotoxic as Chemically Synthesized silver nanoparticles. *Biomed Pharmacol J* 10. 2017. P 337–344.
2. Roychoudhury P., Ghosh, S. Pal, R. Cyanobacteria mediated green synthesis of gold-silver nanoalloy. *J Plant Biochem Biotechnol* 25. 2016. P 73–78.

Ю.А. Антифеева¹, А.В. Фонин¹, О.И. Поварова¹,
М.М. Карасев², И.М. Кузнецова¹, К.К. Туроверов^{1,3}

КОМПЛЕКСНАЯ КОАЦЕРВАЦИЯ ПРОТИМОЗИНА АЛЬФА И ЛИНКЕРНОГО ГИСТОНА Н1 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ PH

¹ Институт цитологии Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

² University of Helsinki, Хельсинки, Финляндия

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

Iu.A. Antifeeva¹, A.V. Fonin¹, O.I. Povarova¹,
M.M. Karasev², I.M. Kuznetsova¹, K.K. Turoverov^{1,3}

COMPLEX COACERVATION OF PROTHYMOSIN ALPHA AND LINKER HISTONE H1 AT VARIOUS PH

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy
of Science, St-Petersburg, Russia

² University of Helsinki, Helsinki, Finland

³ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic
University, St-Petersburg, Russia

julgag@yandex.ru

Взаимодействие разноименно заряженных макромолекул полимеров в растворе может сопровождаться самопроизвольным расслоением системы на две жидкие фазы: обогащенную полимерным веществом (коацерват), и разбавленную. Предполагается, что такая коацервация с участием внутренне неупорядоченных белков может являться одним из механизмов формирования немембранных органелл в клетке [1].

Целью настоящей работы является определение условий, при которых взаимодействие внутренне неупорядоченных белков — протимозина альфа (ПроТа) и линкерного гистона Н1 (Н1), приводит к формированию ими жидких коацерватов *in vitro*. При физиологических условиях (pH = 7.0) ПроТа имеет сильный отрицательный заряд (-43), а Н1 — положительный (+56).

Методом Релеевского рассеяния установлено, что при смешении ПроТа в концентрации превышающей 25 мкМ и гистона Н1 в концентрации 46 мкМ в деионизированной воде, происходит нарушение гомогенности исследуемого раствора. Методом дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии показано, что при смешении ПроТа и гистона Н1 в растворе формируются мелкие коацерватные капли, которые затем сливаются друг с другом с образованием одной крупной капли (коалесцируют). Не более чем за два часа сформированные капли теряют свою способность к коалесценции, т.е. трансформируются в нединамические агрегаты (отвердевают). В настоящей работе было исследовано влияние величины pH на гомогенность смеси, содержащей ПроТа и Н1, а также на морфологию формируемых этими белками конденсатов. Оказалось, что образование конденсатов происходит только в области pH, в которой ПроТа и Н1 заряжены противоположно (4.0 < pH < 9.0). В этом диапазоне pH при выбранных концентрациях целевых белков суммарный положительный заряд Н1 в растворе оказывается в существенной степени скомпенсирован отрицательным зарядом ПроТа и их отношение не превышает 5:1. Считается, что такая компенсация зарядов может способствовать росту агрегированных структур сферической формы [2]. Оказалось, что, как и в деионизированной воде, при взаимодействии ПроТа и Н1 в солевых буферных растворах с различными

значениями pH формируются жидкие сферические конденсаты, которые впоследствии отвердевают.

Полученные данные свидетельствуют о том, что жидкие коацерваты, формируемые при взаимодействии ПрoТа и Н1 являются промежуточным состоянием на пути формирования стабильных нединамичных агрегатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №18-34-00975) и стипендии Президента РФ (СП-259.2019.4)

Литература:

1. Pak, C.W., et al., Sequence determinants of intracellular phase separation by complex coacervation of a disordered protein. *Mol. cell*, 2016. 63(1): 72–85.
2. Desfougeres, Y., et al., Charge and size drive spontaneous self-assembly of oppositely charged globular proteins into microspheres. *J. Phys. Chem. B*, 2010. 114(12): 4138–4144.

Л.С. Бадма-Халгаева^{1,2}, А.А. Захарова¹,
С.С. Ефимова¹, З.М. Саркисян², О.С. Остроумова¹

ВЛИЯНИЕ НОРТАНГЕРЕТИНА НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОДЕЛЬНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

L.S. Badma-Khalkaeva^{1,2}, A.A. Zakharova¹,
S.S. Efimova¹, Z.M. Sarkisyan², O.S. Ostroumova¹

INFLUENCE OF NORTANGERETIN ON THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF MODEL LIPID MEMBRANES

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint-Petersburg, Russia

bkhls90@mail.ru

Флавоноиды являются растительными полифенольными соединениями, проявляющими антиоксидантное, противовоспалительное и бактерицидное действие, что преимущественно определяется их взаимодействием с мембраной. Из литературы известно, что существует некоторая корреляция между строением флавоноидов и их способностью изменять физико-химические свойства липидных мембран вследствие различной глубины погружения [1]. Так, например, генистеин, 4',5,7-тригидроксиизофлавоноид, значительно изменяет как электрические, так и эластические свойства мембраны по сравнению с его гликозидом генистином, 7-О-β-D-глюкопиранозид-генистином. Целью данной работы было исследование влияния агликаона нортангеретина, 4',5,6,7,8-пентагидроксифлавоноид, на физико-химические свойства мембраны и проведение сравнительного анализа эффектов нортангеретина, генистеина и генистина.

Изменение эластических свойств мембраны оценивали по изменению температуры основного фазового перехода дипальмитоилфосфохолина и проницаемости липосом, сформированных из пальмитолеоилфосфохолина, под действием нортангеретина, используя дифференциальную сканирующую микрокалориметрию и флуориметрию утечки кальцеина, соответственно. Модуляцию

электрических свойств определяли по изменению граничного потенциала мембраны путем регистрации нортангин-индуцированного стационарного трансмембранного тока до и после введения в мембраноомывающий раствор тестируемого агента.

Результаты калориметрии показали, что добавка нортангеретина в систему до соотношения липид:флавоноид 10:1 уменьшает температуру плавления мембранообразующих липидов на 0.2 °С. Максимальная утечка кальцеина из липосом составляет 17%. Выявлено, что добавка в мембраноомывающий раствор флавоноидов до концентрации 400 мкМ приводит к уменьшению граничного потенциала мембраны на 45 мВ.

Сравнивая полученные результаты и литературные данные о влиянии на параметры модельных липидных мембран аналогов нортангеретина, генистеина и генистина, можно заключить, что эффективность модификации как эластических, так и электрических свойств мембраны, уменьшается в ряду генистеин>нортангеретин>генистин, что коррелирует с увеличением числа ОН-групп в молекулах этих флавоноидов.

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента РФ №МД-2711.2019.4.

Литература:

1. Efimova S.S., Ostroumova O.S. Effect of dipole modifiers on the magnitude of the dipole potential of sterol-containing bilayers // *Langmuir*. — 2012. — Vol. 28. — P. 9908–9914.

А.А. Баталова¹, Д.А. Белинская¹, Н.В. Гончаров^{1,2}

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПАРАОКСОНА С АЛЬБУМИНАМИ ЧЕЛОВЕКА И БЫКА С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ ОКИСЛЕНИЯ CYS34: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, Санкт-Петербург, Российская Федерация

² Институт гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

A.A. Batalova¹, D.A. Belinskaya¹, N.V. Goncharov^{1,2}

INTERACTION OF PARAXONE AND HUMAN ALBUMINS WITH A VARIOUS DEGREE OF OXIDATION CYS34: COMPARATIVE ANALYSIS BY METHODS OF MOLECULAR SIMULATION

¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, pr. Toreza 44, Saint Petersburg, 194223 Russia

² Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, bld.93 p.o. Kuz'molovsky, Leningrad Region 188663, Russia

batalova.phys@gmail.com

Известно, что сывороточный альбумин (СА) обладает ферментативной активностью по отношению к фосфорорганическим соединениям (ФОС): истинно эстеразной (в сайте Садлоу I) и псевдоэстеразной (в сайте Садлоу II). Трёхмерная структура СА достаточно лабильна, и при взаимодействии с разными веществами имеют место кооперативность и аллостерическая модуляция. Молекула СА содержит одну свободную тиоловую группу в составе цистеина Cys34, которая может образовывать

дисульфиды с тиолами плазмы крови или окисляться до сульфеновой и сульфиновой кислот. Влияние редокс-статуса Cys34 на связывающие и каталитические свойства альбумина практически не изучалось. Цель представленного исследования — на примере параоксона методами молекулярного моделирования оценить влияние степени окисления Cys34 альбуминов человека (ЧСА) и быка (БСА) на их взаимодействие с ФОС.

В работе рассматривали 3 модели степени окисления альбумина: Cys34 восстановлен (Cys34-SH), Cys34 окислен до сульфеновой (Cys34-SOH) или сульфиновой кислоты (Cys34-S(O)O⁻). Комплексы альбумина с параоксоном в сайтах Садлоу I и Садлоу II получали методом молекулярного докинга. Конформационные изменения комплексов альбумина с параоксоном исследовали методом молекулярной динамики. Свободную энергию связывания параоксона с альбумином рассчитывали методом ММ-РBSA. Вероятность (псевдо)эстеразной реакции оценивали по расстоянию между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода каталитических тирозиновых сайтов Садлоу I и II. Согласно полученным данным, редокс-статус Cys34 не оказывает существенного влияния на возможность эстеразной и псевдоэстеразной реакций в сайтах Садлоу I и II ЧСА и БСА. Модификация цистеина изменяет конформацию сайта Садлоу I ЧСА и БСА и положение молекулы параоксона внутри сайта. Окисление альбумина не влияет на конформацию сайта Садлоу II ЧСА и БСА и на положение лиганда в этом сайте. С увеличением степени окисления Cys34 усиливается сродство сайта Садлоу I БСА по отношению к параоксону, тогда как сродство сайта Садлоу I ЧСА не зависит от редокс-статуса остатка цистеина. Влияние редокс-статуса Cys34 на взаимодействие альбумина с ФОС и межвидовые различия следует учитывать при анализе данных экспериментов *in vivo* и *in vitro* с альбумином.

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290142-9 при поддержке грантов РФФИ № 18-15-00304 (вычислительные эксперименты с альбумином человека) и РФФИ № 19-34-90026 (вычислительные эксперименты с альбумином быка).

Э.Х. Бекназарова¹, В.А. Глуценков¹, И.А. Беяева¹
ПОДХОДЫ К КОМПЬЮТЕРНОМУ
МОДЕЛИРОВАНИЮ ПРОЦЕССА
ВОЗДЕЙСТВИЯ ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО
ПОЛЯ ВЫСОКОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ
НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ КЛЕТКУ

¹ Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева (Самарский университет), Самара, Россия

E.H. Beknazarova¹, V.A. Gluschenkov¹, I.A. Belyaeva¹
APPROACHES TO COMPUTER MODELING
OF THE PROCESS OF THE IMPACT
OF A PULSED MAGNETIC FIELD OF HIGH
TENSION TO A BIOLOGICAL CELL

¹ Samara University, Samara, Russia

lapa.d-grad@mail.ru

В работе [1] приведены изменения морфологии и жизнедеятельности клеток под воздействием импульсного магнитного поля (ИМП) высокой напряженности.

Механизм малого воздействия довольно сложен. Это воздействие многофакторное. И единственный путь оценки влияния каждого из них — создание математической модели и компьютерное моделирование процесса.

В докладе описаны подходы к моделированию такого процесса. Клетка представлена как оболочка, заполненная жидкостью.

Использованы уравнения гидродинамики. Сделана попытка использования программного продукта LS-DYNA с применением электромагнитного модуля, с помощью которого анализируются процессы магнитно-импульсного деформирования металлов.

На первом этапе достигнуты результаты по динамической нагрузке — воздействие однократного импульса на внешнюю оболочку, и намечены пути применения электромагнитного модуля на клетку. Требуется дальнейшее освоение и адаптация данного продукта к моделированию процесса изменения клетки под воздействием ИМП.

Литература:

1. Глуценков, В.А., Тюмина, О.В. и другие. Воздействие магнитно-импульсного поля на клеточную культуру человека. Известия Самарского научного центра Российской академии наук, т. 20, № 5(2), 2018. — С. 324–329.

**И.Е. Борисенко¹, М.А. Даугавет²,
 О.И. Подгорная^{1,2,3}, А.В. Ересковский^{1,4}**

НОВЫЙ МАЖОРНЫЙ БЕЛОК
ЖГУТИКОВЫХ КЛЕТОК ЛИЧИНКИ
ГУБКИ ОКАЗАЛСЯ КОНСЕРВАТИВНЫМ:
СТРУКТУРА, ЭВОЛЮЦИЯ, ЭКСПРЕССИЯ
И ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ФУНКЦИИ

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

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

³ Школа биомедицины, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

⁴ Mediterranean Institute of marine and terrestrial Biodiversity and Ecology, Марсель, Франция

**I.E. Borisenko¹, M.A. Daugavet²,
 O.I. Podgornaya^{1,2,3}, A.V. Ereskovsky^{1,4}**

NEW MAJOR PROTEIN OF FLAGELLATED
CELLS IN SPONGE LARVA APPEARS
TO BE CONSERVED: STRUCTURE, EVOLUTION,
EXPRESSION AND SUPPOSED FUNCTIONS

¹ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

³ School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

⁴ Mediterranean Institute of marine and terrestrial Biodiversity and Ecology, Marseille, France

ilja.borisenko@gmail.com

Тип Porifera (губки) находится в самом основании филогенетического древа, поэтому эти примитивные животные представляют собой прекрасный объект для изучения ранних этапов эволюции многоклеточных. На протяжении жизненного цикла губки существуют в прикрепленном виде, в дефинитивном состоянии, и в виде свободноплавающей личинки. Переход

от подвижной личинки к прикрепленному фильтрату осуществляется за счет метаморфоза — процесса, сопровождаемого радикальным изменением плана строения организма. Преемственность между клетками личинки и тканями взрослого организма обсуждается до сих пор. Нашим объектом является губка *Halisarca dujardini* (класс Demospongiae). Ранее с целью прослеживания судьбы клеток личинки была изолирована электрофоретическая белковая фракция поверхностных жгутиковых клеток, содержащая мажорный белок; к данной фракции были получены поликлональные антитела, с помощью которых прослежена судьба жгутиковых клеток в метаморфозе. В настоящей работе нами с помощью центрифугирования в градиенте плотности, SDS-PAGE и тандемной масс-спектрометрии с использованием ранее секвенированного транскрипта была идентифицирована последовательность этого мажорного белка. Поиск в открытых базах данных показал, что он имеет множество ортологов у губок, стрекающих, гребневиков и иглокожих, однако все они ранее не описаны. Полипептид размером около 400 аминокислотных остатков имеет в составе два консервативных домена: TIM-barrel, обладающий ферментативной активностью в отношении макроэргических соединений, и канонический EF-hand, связывающий кальций. В геноме *H. Dujardini* имеется 4 близких паралога гена, кодирующего данный белок. мРНК гена экспрессируется в поверхностных клетках личинки. Мы предполагаем участие данного белка в кальций-опосредованной регуляции энергетического обмена, активация которого предвещает метаморфоз.

Работа выполнена в рамках проекта РФФ № 17-14-01089.

А.Н. Бызова^{1,2}, Ю.А. Нащекина¹

СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ЛИОФИЛЬНОЙ СУШКИ

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

A.N. Byzova^{1,2}, Y.A. Nashchekina¹

NATURAL AND SYNTHETIC POLYMERS BASED SCAFFOLDS OBTAINED BY THE LYOPHIL DRYING METHOD

¹ Institute of Cytology Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

byzovaavozyb@gmail.com

Для изготовления скаффолдов используются такие методы, как электроформирование, фазоразделение, выщелачивание и т.д, но традиционным остается метод лиофилизации, основанный на сублимационном принципе: раствор полимера подвергается воздействию низких температур, после чего возгонкой в вакуумной камере удаляется растворитель. Такая сублимация кристаллов льда приводит к образованию системы взаимосвязанных пор в скаффолдах. Целью данного исследования является изготовление трехмерных пористых скаффолдов с разным размером пор и разной архитектурой при помощи метода лиофилизации.

Для изготовления скаффолдов на основе альгината готовили растворы альгината в воде с концентрациями 1–6%. Для скаффолдов на основе смеси коллагена и хитозана использовали 1%-ый раствор хитозана в 2%-ой уксусной кислоте, растворы коллагена в 0,1М уксусной кислоте с концентрациями 2 мг/мл и 4,9 мг/мл и 1% раствор глутарового альдегида. Также изготавливали двухкомпонентные хитозановые и коллагеновые скаффолды. В процессе эксперимента варьировали объемные соотношения компонентов, получили скаффолды, различные по своей структуре и свойствам.

Замороженные образцы помещали в лиофилизатор при температуре -50С и давлении 1 Торр для удаления растворителя. После высушивания скаффолды на основе смеси коллагена и хитозана обрабатывали 10% раствором NaOH (10 минут) и/или раствором PBS, после чего определяли степень деградации коллагена методом Лоури.

Размер и структуру пор альгинатных, коллагеновых и хитозановых скаффолдов анализировали с помощью метода световой микроскопии.

В результате исследования было показано, что при увеличении концентрации раствора альгината, толщина стенок пор полученных скаффолдов увеличивается с 8 до 15 мкм, а размер пор уменьшается с $23,5 \cdot 10^3$ мкм кв до $4 \cdot 10^3$ мкм кв. В скаффолдах на основе смеси хитозана, коллагена (в соотношении 1:1) и глутарового альдегида (4% от объема смеси) деградация коллагена на 90% меньше по сравнению с образцами без глутарового альдегида. При анализе коллагеновых скаффолдов с увлечением объемного содержания глутарового альдегида (2%, 4% и 10% от общего объема раствора коллагена с концентрацией 2 мг/мл) размер пор не изменяется и составляет $20 \cdot 10^3$ мкм кв, а толщина стенок увеличивается с 10 до 15 мкм.

Таким образом, в результате данной работы была получена серия образцов скаффолдов с разным размером пор. Было показано, что на размер пор и толщину стенок скаффолдов оказывает влияние концентрация раствора полимера. Также продемонстрировано, что обработка скаффолдов глутаровым альдегидом не только существенно снижает деградацию коллагена, но и увеличивает толщину стенок скаффолда.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20-03-00400_a).

М.А. Васильченко-Базарова¹, А.А. Жарикова²,
А.А. Валяева², Д.М. Поташникова¹,
М.А. Тихомирова⁴, Я.Р. Мусинова^{3,4}, Е.В. Шеваль^{1,3}

ВЛИЯНИЕ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ И СТАБИЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ТАТ БЕЛКА ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА НА ЭКСПРЕССИЮ КЛЕТОЧНЫХ ГЕНОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЛИМФОЦИТАХ RPMI 8866

¹ Кафедра клеточной биологии и гистологии, Биологический факультет МГУ

им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

M.A. Vasilchenko-Bazarova¹, A.A. Zharikova²,
A.A. Valyaeva², D.M. Potashnikova¹,
M.A. Tikhomirova⁴, Y.R. Musinova^{3,4}, E.V. Sheval^{1,3}

INFLUENCE OF INDUCIBLE AND STABLE HIV-1 TAT PROTEIN EXPRESSION ON EXPRESSION OF CELLULAR GENES IN CULTIVATED RPMI 8866 LYMPHOCYTES

¹ Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Department of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov State University, Moscow, Russia

⁴ Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

musinova.yana@gmail.com

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) вызывает развитие синдрома приобретённого иммунодефицита. Важную роль в развитии вируса играет белок Tat (трансактиватор транскрипции). Помимо активации транскрипции вирусных генов, этот белок способен покидать инфицированную клетку и проникать в другие близлежащие клетки. В настоящее время для терапии ВИЧ применяется комбинированная антиретровирусная терапия, однако при ее использовании увеличивается частота развитие онкологических заболеваний, например, некоторых В-клеточных лимфом. Предполагается, что, как минимум частично, именно Tat белок отвечает за развитие онкологических заболеваний у ВИЧ-инфицированных пациентов. При этом можно ожидать, что клетка частично компенсирует эффекты Tat белка. Для выяснения возможности компенсации лимфоцитами эффектов вирусного белка была изучена экспрессия генов (RNA-seq) в культивируемых В-лимфоцитах линии RPMI 8866, постоянно или индуцибельно экспрессирующих Tat белок [1]. В ходе анализа были выявлены дифференциально-экспрессируемые гены и построены предсказания ключевых метаболических путей, на которые повлияла экспрессия Tat белка. Некоторые сделанные предсказания были проверены экспериментально. Показано, что индуцибельная экспрессия Tat белка изменяет экспрессию существенно большего числа генов (5592 гена), по сравнению со стабильной экспрессией (1150 генов). При этом индуцибельная экспрессия затрагивает пути связанные с регуляцией пролиферации, репарации и сплайсинга. Эффекты стабильной экспрессии были менее выраженными. При стабильной экспрессии проявились категории, связанные с иммунными реакциями. Анализ клеток подтверждает, что индуцибельная, но не стабильная экспрессия Tat белка сильно влияет на пролиферацию клеток. Таким образом, клетка, действительно способна компенсировать эффекты Tat белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 17-75-20199).

Литература:

1. Горбачева М.А., Тихомирова М.А., Поташникова Д.М., Акбай Б., Шеваль Е.В., Мусинова Я.Р. Создание стабильных клеточных линий на основе культивируемых В-клеток RPMI 8866 с постоянной и индуцибельной экспрессией Tat белка вируса иммунодефицита человека. Онтогенез. 2019. 50(5):348–354.

Д.А. Горбенко^{1,2}, Д.Д. Недорезова¹,
М.Д. Рубель¹, Д.М. Колпащиков³

ВИЗУАЛЬНАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРОКСИДАЗО-ПОДОБНЫХ ДЕЗОКСИРИБОЗИМОВ

¹ ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² ФТИ им. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Университет Центральной Флориды, Орlando, США

D.A. Gorbenko^{1,2}, D.D. Nedorezova¹,
M.D. Rubel¹, D.M. Kolpashchikov³

VISUAL DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA WITH PEROXIDASE-LIKE

¹ ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

² Ioffe Institute, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

³ University of Central Florida, Orlando, USA

daryarogova7@gmail.com

Молекулярная диагностика — это метод селективного анализа конкретных патогенных бактерий и вирусов. В данной работе рассматривается использование гибридных ДНК, имеющих в составе гуаниновые квадруплексы (Г-4). Одним из наиболее интересных свойств Г-4 является то, что он может связываться с геминном (железо (III) -протопорфирин IX) с образованием пероксидазы, имитирующей ДНКзимы и РНКзимы [1].

Были использованы два варианта технологии: бинарный Г-4, образующий комплекс дезоксирибозим-пероксидаза, а также дезоксирибозим-пероксидазный каскад. Бинарный дезоксирибозим состоит из двух цепей ДНК, которые образуют структуру Г-4 при гибридизации с диагностируемой бактериальной ДНК-или РНК-аналитом. Г-4 связывает гемин и катализирует пероксидазозависимое окисление бесцветного субстрата до окрашенного продукта, что можно обнаружить как визуально, так и спектрофотометрически [2]. В каскадном режиме РНК- или ДНК-аналиты распознаются с помощью РНК-расщепляющих дезоксирибозим-зондов с последующим расщеплением химерного субстрата ДНК или РНК, который высвобождает Г-4 в раствор.

Для идентификации бактериальных патогенов мы выбрали специфические гены, которые экспрессируются конститутивно. Была произведена проверка различных генов, относящихся к позднему литическому циклу. Данные гены в основном связаны с белками капсида и оболочки. Мы успешно осуществили каскадное обнаружение нескольких патогенов — *E. coli* и *S. pneumoniae*, а также вирусов дцДНК из группы *Herpes*, *HSV1* и *HSV2*. Ампликоны РНК были получены в реакции NASBA, которая протекает при 41 °С и облегчается путем включения в последовательность сайта узнавания полимеразы T7.

В детекционной части работы РНК-расщепляющие дезоксирибозим-зонды смешивали с синтетическим аналитом или ампликонами РНК в реакционном буфере, инкубировали при 50 °С в течение 60 минут и после этого охлаждали до комнатной температуры. Затем к образцам добавляли гемин, 3,3'-диаминобензидин и перекись водорода для реализации реакции дезоксирибозим-пероксидазного каскада.

Литература:

1. W. Li et al., "Insight into G-quadruplex-hemin DNAzyme/RNAzyme: adjacent adenine as the intramolecular species for remarkable enhancement of enzymatic activity", *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 15, pp. 7373–84, 2016.

2. D.M. Kolpashchikov, "Split DNA enzyme for visual single nucleotide polymorphism typing," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 10, pp. 2934–5, Mar. 2008.

Д.А. Горбенко^{1,2}, А.В. Белашов², Т.Н. Беляева³, И.К. Литвинов³, Е.С. Корнилова³, И.В. Семёнова², О.С. Васютинский²

МОНИТОРИНГ ДИНАМИКИ ГИБЕЛИ КЛЕТОК, ВЫЗВАННОЙ РРiX, МЕТОДОМ ГОЛОГРАФИЧЕСКОЙ ТОМОГРАФИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

¹ ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² ФТИ им. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

D.A. Gorbenko^{1,2}, A.V. Belashov², T.N. Belyaeva³, E.S. Kornilova³, I.V. Semenova² and O.S. Vasyutinskii²

MONITORING OF PPIX-INDUCED CELL DEATH DYNAMICS BY DIGITAL HOLOGRAPHIC TOMOGRAPHY

¹ ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

² Ioffe Institute, of RAS, Saint-Petersburg, Russia

³ Institute of Cytology of RAS, Saint-Petersburg, Russia

daryarogova7@gmail.com

В данной работе мы сообщаем об экспериментах по мониторингу динамики гибели клеток *in vitro*, вызванной фотодинамическим воздействием (ФДВ) с использованием 5-аминолевулиновой кислоты (5-ALA). Анализ был проведен на трех клеточных линиях: на опухолевых клетках культур тканей, таких как клетки эпителиальной карциномы человека HeLa и аденокарциномы легкого человека A549, а также на незлокачественной линии клеток эмбриональных фибробластов мыши 3T3. Как известно, введение 5-ALA вызывает интенсивный внутриклеточный синтез протопорфирина IX (PpIX), эндогенного фотосенсибилизатора, продуцируемого митохондриями [1]. В настоящее время PpIX все чаще используется для лечения и диагностики раковых заболеваний [2].

Кинетику накопления PpIX в клетках анализировали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000. Флуоресценция PpIX возбуждалась на длине волны 405 нм и детектировалась в диапазоне длин волн 610–650 нм, с шагом 1 мкм. Анализ общей интенсивности флуоресценции в клетках, проведенный с помощью программного обеспечения ImageJ, предоставил данные об оптимальном времени инкубации с 5-ALA и его оптимальной концентрации. Было продемонстрировано, что максимальное накопление PpIX во всех клеточных линиях достигается после 3-часовой инкубации с 5-ALA в концентрации 100 мкг / мл. Это приводило к 43%-ному увеличению сигнала флуоресценции PpIX в клетках линий HeLa и A549 и только к 17,4%-ному в клетках линии 3T3.

Анализ изменений клеточной морфологии в ответ на ФДВ проводился с помощью цифровой голографической томографии. Данные о трехмерном распределении внутриклеточного показателя преломления позволяют оценить 11 клеточных параметров, включая объем клеток, сухую массу, площадь клеточной мембраны, площадь прикрепления, высоту и т. д. В экспериментах ФДВ проводилось при оптимальной дозе 5-ALA путем облучения клеток лазерным излучением на длине волны 405 нм и с различными плотностями мощности облучения, варьируемыми в диапазоне 20–100 мВт. Все три

клеточные линии продемонстрировали существенно различную динамику ответа на ФДВ.

Литература:

1. S. Firdousa, M. Nawaza, M. Ikram, and M. Ahmed, *In Vitro Study of Cell Death with 5-Aminolevulinic Acid Based Photodynamic Therapy to Improve the Efficiency of Cancer Treatment*, ISSN 1054-660X, *Laser Physics*, 2012, Vol. 22, No. 3, pp. 626–633.
2. H. Abrahamse, M.R. Hamblin. "New photosensitizers for photodynamic therapy", *Biochem J.*, 473(4), 2016, 347–364.

А.И. Гудович, Е.Ю. Смирнов, А.А. Дакс, А.И. Кизенко, Н.А. Барлев, О.А. Федорова

ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ E3-УБИКВИТИНЛИГАЗЫ PIRH2 ВЕДЕТ К СНИЖЕНИЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ИНГИБИТОРАМ HER2

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Цитологии Российской Академии Наук, Санкт-Петербург

A.I. Gudovich, E.Y. Smirnov, A.A. Daks, A.I. Kizenko, N.A. Barlev, O.A. Fedorova

SUPPRESSION OF THE EXPRESSION OF E3-UBIQUITIN LIGASE PIRH2 LEADS TO DECREASE SENSITIVITY OF CANCER BREAST CELLS AFTER TREATMENT HER2 INHIBITORS

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg

gudovich98@mail.ru

Белок Pirh2 — продукт гена RCHY1 человека — относится к семейству RING-домен содержащих E3-убиквитинлигаз. Одной из его главных функций является убиквитин-зависимая протеасомная деградация p53 — главного белка-онкосупрессора клетки. Важно, что Pirh2 преимущественно индуцирует деградацию p53 при наличии стресса (повреждение ДНК). На сегодняшний день считается, что белок Pirh2 может играть как онкогенную, так и онкосупрессорную роль в опухолевых клетках.

Рак молочной железы (PMЖ) является самой распространенной формой рака у женщин во всем мире. HER2-рецептор эпидермального фактора роста, от экспрессии которого зависит прогноз заболевания. Так, HER2-позитивный PMЖ отличается более агрессивной формой заболевания. Кроме того, у пациентов, обладающих повышенным уровнем экспрессии HER2, наблюдается снижение продолжительности жизни.

Нами был проведен биоинформатический анализ выживаемости, основанный на методе Каплана-Мейера. Мы установили, что при HER2-позитивном PMЖ у пациентов с высокой экспрессией Pirh2 наблюдалась большая вероятность выживания по сравнению с пациентами, обладающими низкой экспрессией данного белка. В связи с этим целью нашего исследования являлось определение влияния экспрессии Pirh2 на устойчивость клеток HER2-позитивного PMЖ к ингибиторам HER2.

В рамках данной работы были получены клеточные линии рака молочной железы BT-474 и SK-BR-3 с разным статусом экспрессии Pirh2 (контроль и нокдаун). С помощью MTT-тестов было показано, что подавление экспрессии Pirh2 ведет к резистентности клеток

к афатинибу, нератинибу и лапатинибу. На основании полученных данных мы предполагаем, что Pirh2 является важным прогностическим биомаркером чувствительности опухолевых клеток HER2-позитивного РМЖ к афатинибу, нератинибу и лапатинибу.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ18-75-1007 би РФФИ 18-315-20013 мол_а_вед.

**М.М. Гузенко¹, М.Ю. Сироткина¹,
В.В. Васильева², Д.М. Дарвиш^{1,2}**

ИНЪЕКЦИОННЫЕ ФОРМЫ КОЛЛАГЕНОВЫХ ГЕЛЕЙ И ИХ МОДИФИКАЦИЯ С ЦЕЛЬЮ УВЕЛИЧЕНИЯ ВЛАГОУДЕРЖИВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ

¹ *Институт Цитологии РАН*

² *Санкт-Петербургский государственный университет технологии и промышленного дизайна*

**M.M. Guzenko¹, M.Y. Sirotkina¹,
V.V. Vasilyeva², D.M. Darvish^{1,2}**

INJECTABLE FORMS OF COLLAGEN GELS AND ITS MODIFICATION IN ORDER TO PREVENT FLUID LOSS

¹ *Institute of Cytology Russian Academy of Science*

² *Saint Petersburg State University of Industrial Technologies and Design*

maria51m@mail.ru

Коллагеновые гели успешно нашли своё применение в регенеративной медицине. С помощью таких гелей получают биосовместимые имплантируемые материалы способные стимулировать регенеративные процессы в соединительных, хрящевых, костных и нервных тканях.

Однако существенным недостатком использования коллагеновых гелей для заполнения поврежденных тканей является его низкая влагоудерживающая способность. Вода не встраивается в структуру фибрилл и очень легко покидает гель при механическом сжатии. Это приводит к тому, что коллагеновый гель перестает заполнять поврежденную область и, таким образом, утрачивает часть своих регенеративных функций. Именно поэтому модификация коллагеновых гелей химическими агентами, позволяющими сохранить влагу в структуре геля, является весьма перспективным направлением.

Целью данной работы являлась разработка инъекционной формы коллагенового геля и его модификация влагоудерживающими агентами.

Для приготовления образцов был использован коллаген I типа, полученный из сухожилий крысиных хвостов методом кислой экстракции. Для модификации гелей с целью увеличения влагоудерживающей способности были выбраны следующие агенты: гиалуроновая кислота, альгинат натрия и полиэтиленгликоль (ПЭГ).

На основании литературных данных [1] была подобрана методика, позволяющая получать инъекционные формы коллагеновых гелей. Полученные таким образом гели модифицировали влагоудерживающими агентами.

В ходе исследований была проведена оценка влагоудерживающей способности коллагеновых гелей под действием постоянной нагрузки, проанализированы механические свойства гелей в режиме пластического сжатия и исследована биодеградация гелей *in vivo*.

Результаты экспериментов показали, что модификация коллагенового геля гиалуроновой кислотой,

альгинатом и низкомолекулярным ПЭГ позволяет снизить потерю влаги. Наилучший результат наблюдался при модификации гелей растворами альгината натрия.

Полученные в ходе исследования данные могут быть использованы при разработке биомедицинских изделий, а также для решения задач тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Работа поддержана грантом РФФИ 20-03-00400\20

Литература:

1. Williams B.R., Gelman R.A., Popke D.C., Piez K.A. Collagen fibril formation. Optimal in vitro conditions and preliminary kinetic results. *J Biol Chem.* 1978; PMID: 28330

**М.А. Даниэль^{1,2}, Д.А. Романова², Е.В. Писарева²,
Е.В. Тимченко², М.Ю. Власов³**

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ СТЕРОИД-ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕЗОРБЦИИ И ВВЕДЕНИЯ МИНЕРАЛЬНОГО КОСТНОГО КОМПОНЕНТА

¹ *Государственный научный центр РФ — Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

² *Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Самара, Россия*

³ *Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия*

**M.A. Daniel^{1,2}, D.A. Romanova², E.V. Pisareva²,
E.V. Timchenko², M.Yu. Vlasov³**

PHYSICAL AND CHEMICAL CHANGES IN BONE TISSUE UNDER THE CONDITIONS OF MODELING STEROID-INDUCED RESORPTION AND INTRODUCTION OF A MINERAL BONE COMPONENT

¹ *State scientific center of the Russian Federation — Institute of medical and biological problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

² *Samara national research University named after academician S.P. Korolev, Samara, Russia*

³ *Samara State Medical University, Samara, Russia*

milena.daniel@yandex.ru

Развитие глюкокортикоидного остеопороза нередко является побочным эффектом длительной терапии стероидными гормонами [1]. В целях перспективного использования в качестве средства профилактики остеопороза активно исследуются свойства минерального костного компонента. Так, целью данного исследования послужило изучение физико-химических свойств костной ткани в условиях моделированной глюкокортикоидной остеорезорбции и введения минерального костного компонента (МКК).

Согласно данным рамановской спектроскопии, пики, соответствующие аморфному фосфату и Амидам I, II, III, имеют наибольшую высоту на спектрах для бедренных костей крыс контрольной группы. Наименьшей высоты данные пики достигают в группах животных с экзотической нагрузкой глюкокортикоидами (ГК), что служит свидетельством нарушения процессов остеосинтеза.

Определение значений коэффициента «Р» продемонстрировало частичную нормализацию соотношения процессов ремоделирования костной ткани при применении МКК.

Значения поверхностной микротвердости определяли по методу Виккерса. Анализ полученных данных показал, что моделирование стероид-индуцированной остеорезорбции приводит к снижению устойчивости костной ткани к микрповреждениям. Инъекции МКК ослабляют данный эффект, что наиболее ярко выражено на фоне действия высоких доз ГК. Было проведено определение механической прочности бедренных костей крыс на трехточечный изгиб. Показатели механической прочности значительно снижаются в условиях моделированной остеорезорбции. Инъекции МКК сопровождаются гораздо менее выраженными изменениями данных показателей.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-315-20017

Литература:

1. Kwok L.K., Tam L.S. Recent advances in the management of steroid induced osteoporosis // *Rheum. Dis.* 2008. V. 8. P. 12–18.

Ю.Д. Диордиенко, Н.М. Мельникова,
М.И. Сулацкий, А.И. Сулацкая

ИНДУЦИРОВАНИЕ ФИБРИЛЛОГЕНЕЗА ЛИЗОЦИМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕМПЕРАТУРНОЙ И ХИМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Yu.D. Diordienko, N.M. Melnikova,
M.I. Sulatsky, A.I. Sulatskaya

INDUCTION OF LYSOZYME FIBRILLOGENESIS USING TEMPERATURE AND CHEMICAL DENATURATION

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

diordienko.yuliya@yandex.ru

Амилоидные фибриллы представляют собой структурированные и высокоупорядоченные волокна, которые могут формироваться на основе широкого спектра различных белков и пептидов. В поисках специфических участков, необходимых для формирования амилоидных фибрилл, были проанализированы десятки тысяч белков и показано, что почти все они содержат по крайней мере несколько амилоидогенных сегментов. При этом оказалось, что 95% предсказанных амилоидогенных участков в нативных условиях находятся внутри белковой глобулы. Однако в случае неправильного фолдинга белков или нарушения их нативной конформации амилоидогенные участки оказываются на поверхности молекулы, что может привести к формированию амилоидных фибрилл в организме. В связи с этим актуальной задачей является выявление внешних факторов, способных приводить к образованию патологических или функционально активных амилоидных фибрилл. Целью данной работы стало исследование денатурирующих воздействий, способных индуцировать образование амилоидных фибрилл на основе высокостабильного глобулярного белка лизоцима.

В первую очередь, для получения амилоидных фибрилл на основе лизоцима, была применена тепловая денатурация. Визуализация полученных образцов, регистрация их фотофизических характеристик и анализ взаимодействия с амилоид-специфическим флуоресцентным зондом тиофлавином Т позволили сделать заключение о том, что повышение температуры до 60 °С приводит лишь к образованию неупорядоченных агрегатов лизоцима, но не индуцирует его фибрилlogenез.

В связи с неэффективностью тепловой денатурации для решения поставленной задачи мы попытались использовать химическую денатурацию. Анализ литературных данных позволил сделать заключение о слабом воздействии денатурирующего агента мочевины на структуру и активность мономерного лизоцима. В присутствии мочевины в концентрации до 6 М структура белка слегка стабилизируется, а затем происходит переход белка в состояние расплавленной глобулы без разворачивания α -спиральных структур. При этом оказалось, что присутствие гуанидин гидрохлорида (GdnHCl) может индуцировать конформационные изменения в белке, приводящие к существенной утрате его активности. Мы показали, что при нагревании белка до 60 °С в присутствии даже небольшой концентрации GdnHCl (0.05 М) наряду с образованием неупорядоченных агрегатов лизоцима происходит формирование амилоидных фибрилл на основе этого белка. При этом повышение концентрации GdnHCl в пробе до 3 М приводит к преимущественному формированию фибриллярных агрегатов лизоцима.

Анализ полученных результатов позволил сделать заключение о том, что тепловая денатурация и присутствие денатурирующего агента гуанидин гидрохлорида по отдельности не приводят к индуцированию фибрилlogenеза лизоцима, однако, совокупное действие этих факторов приводит к образованию амилоидных фибрилл на основе этого белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-74-10100).

Е.Е. Дьяконов¹, Т.О. Артамонова²,
М.А. Ходорковский², А.С. Цимиха¹.

ПОИСК СПЕЦИФИЧЕСКИХ ДЛЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕАСОМ ПОСТ-ТРАНЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ

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

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

E.E. Diakonov¹, T.O. Artamonova²,
M.A. Khodorkovskii², A.S. Tsimokha¹.

SEARCH FOR EXTRACELLULAR PROTEASOME-SPECIFIC POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS

¹ *Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia*

² *Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia*

e.diakonov@incras.ru

Деградация белков в клетке является необходимым процессом для поддержания клеточного гомеостаза и его нарушения могут приводить ко многим заболеваниям. Большую часть клеточных белков специфически расщепляет протеасома в составе убиквитин-протеасомной системы. Протеасомы также обнаруживаются

во внеклеточном пространстве, и их концентрация увеличивается при опухолевой трансформации и других патологиях. Внеклеточные протеасомы представлены только интактными 20S-протеасомами без регуляторных частиц, что свидетельствует об их избирательной селективности из внутриклеточного протеасомного пула для последующей секреции. Тем не менее, механизм секреции внеклеточных протеасом и их функции остаются неизвестными. Мы предполагаем, что внеклеточные протеасомы могут обладать специфическими пост-трансляционными модификациями, которые способствуют их избирательной селективности для секреции. Чтобы проверить эту гипотезу, мы провели MALDI FT-ICR MS-анализ клеточных и внеклеточных протеасом, аффинно очищенных из клеточного экстракта и кондиционированной среды культивирования, соответственно, клеток человека линии K562. В результате мы получили следующий список пост-трансляционных модификаций, потенциально специфичных для внеклеточных протеасом: S216-p α 4-субъединицы, K237,238 ac β 2, S181-p β 3, K192-ac β 3, Y125-ac β 5 (p — фосфорилирование, ac — ацетилирование, α и β — субъединицы 20S протеасомы, S-серин, Y-тирозин, K-лизин). Для анализа влияния элиминирования сайтов этих пост-трансляционных модификаций на секрецию протеасом во внеклеточное пространство, в клетках линии HeLa β 3-субъединица протеасомы дикого типа была замещена экзогенной β 3-субъединицей с нейтральной немодифицирующей аминокислотой Ala по сайтам модификаций S181-p и K192R-ac. Для этого в клетки HeLa с CRISPR/Cas9-опосредованным нокаутом гена β 3 (*PSMB3*) ввели лентивирусной трансдукцией экспрессионные конструкции с мутантными последовательностями β 3 и последовательностью дикого типа. Вестерн-блот-анализ с использованием антител к протеасомной субъединице α 6 не выявил различий в количестве протеасом в образцах сред, кондиционированных полученными стабильными клеточными линиями HeLa с элиминированными сайтами пост-трансляционных модификаций S181-p и K192R-ac. Таким образом, пост-трансляционные модификации β 3-субъединицы S181A-ри K192-ac не являются специфичными для внеклеточных протеасом, однако, будет продолжен анализ оставшихся в вышеупомянутом списке потенциально специфичных пост-трансляционных модификаций внеклеточных протеасом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-01168.

Л.М. Забегина^{1,2}, С.Е. Титов^{3,4}, М.К. Иванов^{3,4},
И.В. Назарова¹, А.В. Малек^{1,5}.

**МИКРОРНК ИЗ ТПО(+) ЭКЗОСОМ —
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МАРКЕР ДЛЯ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ
И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ФОРМ
Фолликулярных Опухолей
Щитовидной Железы**

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова, Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный

² Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Россия, Санкт-Петербург

³ Институт молекулярной и клеточной биологии, Россия, Новосибирск

⁴ Вектор-Бест, Россия, Новосибирская обл., Новосибирский рай

⁵ Онкосистема, Россия, Москва

L.M. Zabegina^{1,2}, S.E. Titov^{3,4}, M.K. Ivanov^{3,4},
I.V. Nazarova¹, A.V. Malek^{1,5}.

**MICRORNA FROM TPO (+) EXOSOM
AS POTENTIAL MARKER FOR
DIFFERENTIATING MALIGNANT AND BENIGN
FORMS OF FOLLICULAR THYROID TUMORS**

¹ National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Petrova, Russia, Saint-Petersburg

² Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Russia, Saint-Petersburg

³ Institute of Molecular and Cellular Biology, Russia, Novosibirsk

⁴ Vector-Best, Russia, Novosibirsk region

⁵ Oncosystem; Russia, Moscow

lidiazabegina@gmail.com

Одна из основных проблем в диагностике узловых образований щитовидной железы — отсутствие методов оценки степени злокачественности фолликулярных образований на дооперационном этапе. Тонкоигольная аспирационная биопсия — наиболее информативный метод дифференциальной диагностики заболеваний щитовидной железы, его точность составляет порядка 95%. Однако, цитологическое исследование не позволяет идентифицировать фолликулярный рак щитовидной железы (ФРЦЖ), лишь позволяя определить риск злокачественности: 10–40% для фолликулярной неоплазии (Bethesda IV), 6–28% для фолликулярного изменения неопределенного значения (Bethesda III). Альтернативой может быть жидкостная биопсия, в частности, выделение из плазмы мембранных везикул (экзосом) и анализ экзосомальной микроРНК. Известно, что опухолевые клетки секретируют специфический набор микроРНК в состав экзосом. С учетом того, что экзосомы вовлечены в развитие патологических процессов, анализ состава микроРНК циркулирующих в крови экзосом можно рассматривать как новый перспективный метод диагностики рака щитовидной железы и как способ дифференцировки фолликулярной аденомы (ФА) и фолликулярного рака (ФРЦЖ). При этом выделение и анализ ткане-специфичной фракции везикул может повысить диагностическую ценность метода.

Экзосомы выделяли из плазмы крови пациентов с гистологически верифицированным диагнозом ФА и ФРЦЖ методом ультрацентрифугирования (Optima XPN-80 Beckman Coulter). Из общей популяции была выделена фракция thyroid-специфичных экзосом с использованием антител против Thyroid Peroxidase с биотином (Anti-Thyroid Peroxidase/TPO antibody (Biotin) (ab240545)) и магнитных частиц, покрытых стрептавидином (KO180 Sileks). Первичный анализ профиля концентраций экзосомальных микроРНК был проведен с помощью набора «MiRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR system» компании EXIQON. Валидация полученных данных была проведена путем микроРНК-специфичной обратной транскрипции и последующей ПЦР материала опухолевой РНК, полученного от 30 пациентов с ФА и 30 пациентов с ФРЦЖ.

В результате анализа профиля экзосомальной микроРНК было отобрано несколько микроРНК семейства Let-7, уровень концентрации которых в ТПО(+) экзосомах отличается для ФА и ФРЦЖ.

Выявление специфичных для фолликулярного рака молекул микроРНК может послужить одним из способов дифференцировки ФА и ФРЦЖ.

Литература:

1. McHenry, C.R. Follicular Adenoma and Carcinoma of the Thyroid Gland / C.R. McHenry, R. Phitayakorn // *The Oncologist*. — 2011. — Vol. 16 — № 5 — P. 585–593 — doi:10.1634/theoncologist.2010-0405.
2. Rappa, G. Extracellular vesicles from thyroid carcinoma: The new frontier of liquid biopsy / G. Rappa, C. Puglisi, M.F. Santos, S. Forte, L. Memeo, A. Lorico // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — Vol. 20 — № 5 — doi:10.3390/ijms20051114.

**А.А. Захарова, Т.Е. Тертычная,
С.С. Ефимова, О.С. Остроумова**

**ЗАВИСИМОСТЬ ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ
АКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ
ОТ ТОЛЩИНЫ МОДЕЛЬНЫХ ЛИПИДНЫХ
МЕМБРАН**

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

**A.A. Zakharova, T.E. Tertychnaya,
S.S. Efimova, O.S. Ostroumova**

**DEPENDENCE OF THE PORE-FORMING
ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES
ON THE THICKNESS OF MODEL LIPID
MEMBRANES**

Institute of Cytology, RAS, Saint Petersburg, Russia

tertysh24@mail.ru

Использование антимикробных пептидов может служить альтернативой традиционной антибиотикотерапии. Аминокислотные последовательности антимикробных пептидов образуют амфипатическую α -спираль при связывании с мембранами. В распознавании не участвуют рецепторы на клеточной поверхности, что указывает на то, что специфичность действия антимикробных пептидов определяется составом липидного бислоя клеток-мишеней [1].

Целью данной работы являлось установление зависимости способности мастопарана формировать ион-проницаемые поры от толщины модельных липидных мембран.

Электрофизиологическим методом установлено, что введение мастопарана к (18:1)ФС(18:1)ФЭ (50:50 mol%) мембранам до концентрации 2–7 мкМ в мембраноомывающий раствор (1 М КСl, 5 мМ НЕРЕС, рН 7.4) в трети экспериментов приводило к появлению ступенеобразных флуктуаций тока. Увеличение концентрации пептида до 7 мкМ вызывало нарушение стабильности мембран и последующее их разрушение. При введении мастопарана в раствор, омывающий (16:0/18:1)ФХ:ФЭ:ФГ (25:25:50 mol%) и ME(16:0)-липидные бислои до концентрации 10 мкМ увеличения ионной проницаемости мембран не наблюдали. Установлено, что в диапазоне концентраций от 0.5 до 1 мкМ при добавлении к (16:1)ФХ:Хол (90:10 mol%) и (14:1)ФХ:Хол (90:10 mol%) мембранам, мастопаран во всех случаях индуцировал появление характерных шумов проводимости и флуктуаций трансмембранных пор. При концентрациях пептида более 9 мкМ происходила дестабилизация мембран.

Полученные данные указывают на увеличение порообразующей активности мастопарана в мембранах меньшей толщины.

Работа выполнена при поддержке грантов РНФ 19-14-00110 и РФФИ 18-34-20047 мол_а_вед.

Литература:

1. Wade D., Boman A., Wahlin B., Drain C.M., Andreu D., Boman H.G., Merrifield R.B. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;87:4761–4765.

**А.А. Иванова¹, Е.Ю. Симоненко¹, В.В. Прыдун¹,
А.Г. Миронова², А.Н. Васильев¹**

**ИЗМЕНЕНИЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ
ХАРАКТЕРИСТИК КРИОПРОТЕКТОРА
НА ОСНОВЕ ВОДНО-ГЛИЦЕРИНОВОГО
РАСТВОРА ПОСЛЕ ДОБАВЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ
КОМПОНЕНТ**

*¹ Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова, Москва, РФ*

² ИБХФ РАН, Москва, РФ

**A.A. Ivanova¹, E.U. Simonenko¹, V.V. Prydun¹,
A.G. Mironova², A.N. Vasiliev¹**

**CHANGE IN THERMODYNAMIC
CHARACTERISTICS
OF CRYOPROTECTANTBASEDONWATER-
GLYCEROL SOLUTION AFTER ADDING VARIOUS
COMPONENTS**

*¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow,
Russia*

² IBCP RAS, Moscow, Russia

Annetkurella@yandex.ru

Развитие методов криоконсервации биоматериала расширяет возможности современной биологии и медицины. Для защиты клеток от повреждений используют криопротекторы, эффективность которых обычно оценивается по изменениям жизненно важных показателей клеток после заморозки. Основным фактором повреждения клеток является формирование кристаллов льда. Для водных растворов с примесями выделяют область гетерогенного ядрообразования, приводящего к образованию центров кристаллизации внутри и вне клетки [1]. Добавление непроницающих компонент криопротектора позволяет уменьшить этот промежуток и повысить выживаемость клеток. В связи с этим важно понимать физико-химические процессы, проходящие в криопротекторах при добавлении отдельных его компонент [2].

Поэтому целью работы является определение влияния отдельных компонент криопротектора на изменение его термодинамических характеристик, а также исследование изменения фазовых и агрегатных состояний этих сред.

В работе были получены зависимости теплоемкости от температуры для буферной среды (12% глицерина); выявлено наличие 3-х особенностей, связанных со структурными перестройками среды при изменении температуры. Для водного раствора глицерина (12%) температура фазового перехода первого рода — 246,4 К, промежуточная температура, характеризующая агрегатные изменения в гетерогенной фазе, — 204,1 К, температура перехода из гетерогенной области в низкотемпературную часть — 168,3 К. Во всех растворах можно наблюдать стадию переохлажденной жидкости с образованием в ней ядер нуклеации. Наличие области гетерогенного ядрообразования объясняет появление пиков в этой области на графике зависимости теплоемкости от температуры. Было выявлено, что добавление сахара в глицерин-содержащий раствор уменьшает температурный интервал гетерогенного ядрообразования

на 18,9 К, что должно улучшать криопротекторные свойства данного раствора.

Литература:

1. Vali G., Principles of Ice Nucleation// Biological ice nucleation and its applications, 1995, p.5
2. Симоненко Е.Ю., Прядун В.В., Иванова А.А., Бурмистрова Е.В., Васильев А.Н., Яковенко С.А, Метод адиабатической калориметрии для определения термодинамических характеристик криопротекторов// Биофизика, 2019, том 64, вып.1, с. 5–11

А.Р. Ильина^{1,3}, В.П. Октябрьский^{1,2}, Л.Т. Рязанцева¹ ПАРНИКОВЫЙ ЭФФЕКТ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЧЕЛОВЕКА

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия

A.R. Ilina^{1,3}, V.P. Oktyabrskiy^{1,2}, L.T. Ryazanceva¹ THE GREENHOUSE EFFECT AND HUMAN GENETIC ACTIVITY

¹ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Russia

² Federal state budgetary institution "National medical research center named after V.A. Almazov" of Ministry of health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Saint Petersburg, Russia

vokt@yandex.ru

Состояние окружающей среды беспокоит людей, поскольку связано с их здоровьем. Известно, что основные парниковые газы (ПГ): пары воды (ПВ), углекислый газ и озон; вследствие парникового эффекта (ПЭ) влияют на генетическую активность человека [1]. Его геном представляет собой совокупность наследственного материала, содержащегося в клетке. Он находится в молекулах ДНК в ядре и митохондриях клетки. ДНК имеют разные линейные размеры и поэтому имеют разные резонансные частоты, на которые реагирует геном. В ИК области они совпадают с частотами в спектре поглощения ДНК. В работе предлагается расчетная модель ПЭ для оценки воздействия на геном человека оптической мощности излучения в ИК области на полосе колебаний (О1О) ПВ (совпадающей с частотой ядерной ДНК) в русской бане (РБ) и финской сауне (ФС). Эту мощность рассчитывали в дипольном приближении по известной классической формуле для излучения диполя в квантово-механическом рассмотрении. В итоге мощность определялась произведением вероятности спонтанного перехода на населенности на колебательном уровне (О1О) ПВ (с учетом влажности соответственно в РБ и ФС, а также температуры) и на энергию рассматриваемого колебания. Оказалось, что эти две мощности излучения совпадают и они существенно больше, чем соответствующие тепловые мощности, рассчитанные для печи и оптические мощности, излучаемые (поглощаемые) всеми ядерными ДНК человека [1]. Поэтому, так же, как и в случае ПГ,

парниковый эффект в РБ и ФС может влиять на человека, оказывая на него воздействие, например, через мембраны определенных клеток кожи. Из-за значительного преобладания полученных оптических мощностей, падающих в этом случае за счет парникового эффекта над мощностью, поглощаемой геномом на частоте (О1О) паров воды, возможно существенное влияние на генетическую активность человека и, следовательно, его здоровье.

Литература:

1. Oktyabrskiy V. Effect of greenhouse gases on human genetic activity. Ekoloji. 2019; 28(108): 2715–2719.

Л.С. Ключова ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОДУЛЯТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ, ОКАЗЫВАЕМЫХ НА ФЕРМЕНТЫ ЦИТОХРОМА P450

Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики — структурное подразделение ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия

L.S. Klyushova

HIGH CONTENT SCREENING OF POTENTIAL DRUG COMPOUNDS TO DETECT MODULATORY EFFECTS ON CYTOCHROME P450 (CYP) ENZYMES

Institute of Molecular Biology and Biophysics — subdivision of FRC FTM, Novosibirsk, Russia

klyushoval@mail.ru

Цитохром P450 (CYP) является суперсемейством ферментов, важных в метаболизме лекарств, среди которых основной вклад вносят CYP3A4, CYP2C9 и CYP2C19 [1]. Показано, что модуляция CYP3A4 вызывает биологические ответы, которые можно использовать для лечения онкологических заболеваний [2]. Данное исследование направлено на изучение модуляторных эффектов, оказываемых на ферменты цитохрома P450 (CYP3A4, CYP2C9 и CYP2C19) перспективными потенциальными противоопухолевыми препаратами — нитрозокомплексами рутения, а также смешаннолигандными комплексами эндогенных металлов на основе полипиридиновых лигандов и производных изотиазола/тетразола [3]. Для оценки эффектов использовали высокопроизводительный скрининг (HCS, high content screening), сочетающий автоматическую флуоресцентную микроскопию с количественным анализом изображений, что позволяет получать большое количество информативных измерений на уровне отдельных клеток [4].

В результате исследования на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) был определен диапазон токсичности новых веществ и изучен их модуляторный эффект на CYP3A4, CYP2C9 и CYP2C19 на уровне мРНК и белка. Оценка влияния новых соединений на ферменты P450 с одновременной оценкой клеточной морфологии, позволила выделить субпопуляции клеток с различными типами изменений их состояния. Результаты биоинформатического анализа позволили предложить *in vitro* модель для выявления соединений, обладающих противоопухолевой активностью, применительно к высокопроизводительной технологии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90129.

Литература:

1. Zanger U.M., Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013; 138(1): 103–141.
2. Lolodi O. et al. Differential Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and Its Implication in Drug Discovery. *Curr Drug Metab.* 2017; 18(12): 1095–1105.
3. Eremina J. A. et al. Mixed-ligand copper(II) complexes with tetrazole derivatives and 2,2'-bipyridine, 1,10-phenanthroline: synthesis, structure and cytotoxic activity. *Inorg. Chim. Acta.* 2019; 487: 138–144.
4. Mattiazzi U.M. et al. High-Content Screening for Quantitative Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 2016; 26(8): 598–611.

О.А. Колесникова^{1,3}, В.О. Шипунова^{1,2},
В.Д. Соловьев^{1,4}, С.М. Деев^{1,2}

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ К HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ РАКОВЫМ КЛЕТКАМ

¹ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемакина

и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

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

³ Московский Государственный Университет
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Национальный Исследовательский Ядерный
Университет «МИФИ», Москва, Россия

O.A. Kolesnikova^{1,3}, V.O. Shipunova^{1,2},
V.D. Soloviev^{1,4}, S.M. Deev^{1,2}

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES FOR THE TARGETED DELIVERY TO HER2-POSITIVE CANCER CELLS

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry RAS, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (National
Research University), Dolgoprudny, Russia

³ M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow,
Russia

⁴ National Research Nuclear University MEPhI (Moscow
Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

olya325@gmail.com

Одной из наиболее актуальных областей применения наночастиц является разработка новых подходов к терапии онкологических заболеваний. Ряду материалов наноразмерной природы присущи уникальные свойства, позволяющие их использовать для задач биомедицины, такие как флуоресценция, магнетизм, возможность адресной доставки к клеткам-мишеням или нагрев внешними электромагнитными полями. В частности, наночастицы магнетита обладают магнитными свойствами, биосовместимы и относительно нетоксичны. Более того, свойство индуктивного нагревания во внешних полях и процессы релаксации позволяют использовать такие частицы в качестве источника локальной управляемой гипертермии опухолей.

Целью данной работы является получение наночастиц магнетита для адресной доставки к HER2-положительным раковым клеткам. Нами были синтезированы наночастицы магнетита микро эмульсионным методом. Размер наночастиц был охарактеризован с помощью сканирующей электронной микроскопии и составил 19.7 ± 4.7 нм. Поверхность наночастиц магнетита модифицировали полимерным покрытием, а именно, карбоксиметил-декстраном. Далее наночастицы конъюгировали с HER2-распознающими белками для адресной доставки к опухоли, в частности, с полноразмерным анти-HER2 антителом Трастузумаб.

Для демонстрации эффективности связывания модифицированных наночастиц с HER2-сверхэкспрессирующими клетками использовали клеточную линию аденокарциномы молочной железы человека SKBR-3. Клеточную линию CHO использовали в качестве негативного контроля. Методом МРQ-цитометрии было показано, что модифицированные наночастицы высокоэффективно связываются с HER2-положительными раковыми клетками. Для клеточной линии CHO не была показана специфичность действия полученных наночастиц.

Таким образом, нами были получены коллоидные наночастицы с поверхностью, ковалентно модифицированной HER2-распознающим белком, сохраняющим свою активность *in vitro*. Данная работа является шагом на пути к созданию эффективных агентов таранотки.

Исследование поддержано грантом РФФ, проект № 17-74-20146.

В.А. Консон¹, Ю.А. Нащёкина^{1,2}

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АЛЬГИНАТНЫЕ ГЕЛИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет
(СПбГУ), Санкт-Петербург, Россия

V.A. Konson¹, Y.A. Nashchekina^{1,2}

MODIFIED ALGINATE GELS FOR CELL CULTURE

¹ Institute of Cytology Russian Academy of Science,
Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University (SPbU), Saint
Petersburg, Russia

vkonson@gmail.com

В настоящее время в тканевой инженерии широко используются гели на основе природных полимеров. Одним из таких полимеров является альгинат натрия, способный к образованию геля в присутствии катионов (обычно кальция). Недостаток альгината — его отрицательный заряд, препятствующий адгезии клеток, что не позволяет использовать его для трансплантации.

Целью данной работы является увеличение биосовместимости альгинатных гелей для культивирования клеток за счет его модификации положительно заряженными аминокислотами — аргинином или лизином.

Были приготовлены альгинатные капсулы из раствора альгината с различной концентрацией (1–3%). Для уменьшения общего отрицательного заряда альгинатного геля капсулы были модифицированы аминокислотами — аргинином или лизином путём введения аминокислот в раствор альгината натрия. Способность аминокислот связываться с альгинатным гелем

оценивали с помощью нингидриновой реакции по количеству вышедшей из альгинатного геля в раствор аминокислоты. Для оценки цитосовместимости модифицированных альгинатных гелей внутри капсул культивировали фетальные мезенхимные стволовые клетки человека (fetMSC) и клетки глиомы крысы (C6).

В результате эксперимента было показано, что с увеличением доли аргинина в геле процент выхода ее в раствор уменьшается: для гелей, содержащих 0,15%, 0,3%, 0,6% аргинина через сутки после инкубирования в воде выход составил 15%, 10% и 8% соответственно. Показано, что с увеличением объема жидкости, в которой инкубировали гели, выход аминокислоты тоже увеличивается: через сутки после инкубирования геля с содержанием аргинина 0,15% в 600 мкл, 1200 мкл и 2500 мкл воды выход составил 15%, 20% и 42% соответственно. Для гелей с аналогичным содержанием лизина показано, что спустя 1 час после инкубирования в 2500 мкл воды выход составляет 50%, 26% и 14%, спустя сутки — 42%, 24% и 20%. При сравнении количества вышедших из геля аминокислот оказалось, что в среднем при инкубировании в течение суток лизина выходит на 38,4% больше, чем аргинина.

В результате культивирования клеток было выявлено, что в гелях из чистого альгината клетки образуют агрегаты, а в присутствии аргинина располагаются дискретно.

Таким образом, полученные субстраты, модифицированные аминокислотами, потенциально могут быть использованы в качестве носителя для культивирования клеток для их трансплантации.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20-03-00400_a).

П.А. Котельникова¹, В.О. Шипунова^{1,2,3}, С.М. Деев^{1,3}

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ НА ОСНОВЕ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ

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

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

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

P.A. Kotelnikova¹, V.O. Shipunova^{1,2,3}, S.M. Deyev^{1,3}
MULTIFUNCTIONAL AGENTS BASED ON SILVER NANOPARTICLES

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia

³ National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia

kotelnikova@phystech.edu

Работа посвящена созданию многофункциональных конструкций для диагностики и терапии опухолей. Серебряные наночастицы (НЧ) обладают свойством локализованного поверхностного плазмонного резонанса — когерентных колебаний электронов проводимости, возбуждаемых падающим светом. Среди металлов серебро обладает лучшими плазмонными

характеристиками в оптической области, при этом синтез серебряных частиц значительно дешевле, чем, например, золотых. Рассеяние света серебряными НЧ позволяет детектировать их на поверхности клеток без дополнительной модификации флуоресцентными метками. Резонансное поглощение света наночастицами может использоваться для фототермической терапии опухолей.

Нами были синтезированы наночастицы серебра различных размеров и форм. Частицы были охарактеризованы методами сканирующей электронной микроскопии, оптической спектроскопии и динамического светорассеяния. Мы разработали метод модификации серебряных НЧ белками без предварительного покрытия поверхности частиц полимерами. В качестве визуализирующего агента мы использовали люциферазу Nanoluc. Люцифераза Nanoluc широко используется для биоимиджинга, так как не требует доставки света от диода или лазера, а ее субстрат фуримазин может быть введен в организм внутривенно. Благодаря этому люцифераза может быть использована для прижизненной визуализации глубоких опухолей. В качестве направляющего белка мы использовали трастузумаб, моноклональное антитело к онкомаркеру HER2/neu. Нами было продемонстрировано специфичное связывание полученных конструкций с раковыми клетками, сверхэкспрессирующими рецептор HER2/neu. Была исследована цитотоксичность модифицированных частиц на клетках различных линий, и было показано, что токсическое действие может вызываться, в том числе, генерацией активных форм кислорода в клетках. Таким образом, в работе были получены таргетные наноконструкции для направленной доставки соединений, терапии и визуализации опухолевых клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-34-70136.

А.В. Кривошей^{1,2}, В.И. Бархатов^{1,2}, А.А. Ефремов², Е.К. Матвейшина², П.В. Вржешч^{1,2}

ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ КООПЕРАТИВНОСТЬ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ СУБСТРАТА (АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ) И ОБРАТИМЫХ ИНГИБИТОРОВ С ДИМЕРНЫМ ФЕРМЕНТОМ ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗОЙ

¹ Международный учебно-научный биотехнологический центр Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

A.V. Krivoshey^{1,2}, V.I. Barkhatov^{1,2}, A.A. Efremov², E.K. Matveishina², P.V. Vrzhesch^{1,2}

NEGATIVE COOPERATIVITY OF BINDING OF THE SUBSTRATE (ARACHIDONIC ACID) AND REVERSIBLE INHIBITORS TO DIMERIC ENZYME PROSTAGLANDIN H SYNTHASE

¹ International Biotechnological Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

krivoshey.alex@gmail.com

Синтез простагландинов (регуляторов воспаления, иммунного ответа и многих других физиологических процессов) осуществляется в результате циклооксигеназного окисления арахидоновой кислоты (АА), катализируемого гомодимерным ферментом простагландин-Н-синтазой (PGHS). Фермент является фармакологической мишенью для всех нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП).

Ранее в литературе приводились экспериментальные данные, свидетельствующие о возможном взаимодействии между мономерами в составе димера PGHS. Однако механизм этого взаимодействия до сих пор не установлен.

В настоящем исследовании показано, что взаимодействие PGHS с ингибиторами ибупрофеном и толметином не описывается в рамках обычно используемых схем, но может быть описано с учётом отрицательной кооперативности при связывании ингибитора, когда первая молекула ингибитора образует более прочный комплекс, чем вторая (для ибупрофена $K_1 = 0.74$ мкМ, $K_2 = 11$ мкМ, для толметина $K_1 = 0.12$ мкМ, $K_2 = 1.3$ мкМ). Аналогичные результаты ранее были показаны для напроксена ($K_1 = 0.1$ мкМ, $K_2 = 9.2$ мкМ). Продемонстрировано, что взаимодействие фермента с арахидоновой кислотой также может быть описано моделью, учитывающей отрицательную кооперативность (сродство фермента к первой молекуле субстрата 14 мкМ, ко второй — 1 мМ).

Полученные результаты следует учитывать в ходе исследования синтеза простагландинов и фармакологических эффектов НПВП *in vivo*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-01150а с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета, и оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

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

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ КОНЬЮГАТА ХЛОРИНА Е6 С ВАНДЕТАНИБОМ КАК АГЕНТА ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ И ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ

Университет Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

L.V. Krylova, N.N. Peskova, A.B. Volovetsky, S.Yu. Pronina, V.F. Otvagin, N.S. Kuzmina, A.Yu. Fedorov, I.V. Balalaeva

STUDY OF THE ANTITUMOR ACTIVITY OF THE CHLORINE E6 AND VANDETANIB CONJUGATE AS AN AGENT FOR COMBINED PHOTODYNAMIC AND TARGETED THERAPY

Lobachevsky University, Nizhny Novgorod, Russia

lu.krylova@mail.ru

Концепция создания гибридных противоопухолевых препаратов заключается в объединении нескольких терапевтических агентов с различным механизмом действия с целью повышения эффективности препаратов и преодоления резистентности опухоли к терапии. Ранее

нами был получен конъюгат цинкового комплекса хлорина е6 с вандетанибом и дигалактозиллом (ZnChI-Vd) [1], в качестве противоопухолевого агента для комбинированной фотодинамической (ФДТ) и таргетной терапии. Под действием света хлорин запускает фотохимические реакции в клетке-мишени. Вандетаниб представляет собой ингибитор тирозинкиназной активности рецепторов ростовых факторов EGFR и VEGFR. Целью данной работы явилось исследование противоопухолевой активности ZnChI-Vd на клеточных культурах *in vitro* и экспериментальных ксенографтных опухолях *in vivo*.

Зарегистрированы фотофизические свойства и определен квантовый выход флуоресценции ZnChI-Vd и ZnChI. Исследования внутриклеточного распределения и определение цитотоксичности проводили *in vitro* на культурах клеток эпидермоидной карциномы человека A-431 (EGFR+), и клеток яичника китайского хомячка CHO (EGFR-, VEGFR-). Специфичность накопления и противоопухолевую активность ZnChI-Vd *in vivo* исследовали на иммунодефицитных мышцах с подкожно привитой опухолью A-431.

Исследованные соединения характеризуются интенсивным поглощением и флуоресценцией в красной области спектра, квантовый выход не превышает 10%. Установлено быстрое накопление ZnChI-Vd и ZnChI в клетках A-431 с локализацией в лизосомах, везикулах и аппарате Гольджи. Показан выраженный цитотоксический эффект ZnChI-Vd в отношении A-431. В исследованиях *in vivo* продемонстрирована высокая селективность накопления ZnChI-Vd в опухоли и показана его противоопухолевая активность, как в условиях локального облучения, так и в темноте, что свидетельствует о двух механизмах воздействия на опухоль.

Полученные данные свидетельствуют о противоопухолевой активности исследуемого соединения и позволяют рассматривать его в качестве потенциального агента для ФДТ с комбинированным действием.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-33-20041)

Литература:

- Otvagin V.F. et al. Water-Soluble Chlorin/ Arylaminoquinazoline Conjugate for Photodynamic and Targeted Therapy // J. Med. Chem. 2019; 62, 11182–11193.

А.Е. Кулешова, Л.В. Пурвиньш, Е.Е. Буркова, С.Е. Седых, Г.А. Невинский

ИЗУЧЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ЭКЗОСОМ МОЛОКА

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

A.E. Kuleshova, L.V. Purvinsh, E.E. Burkova, S.E. Sedyh, G.A. Nevinsky

STUDY OF MILK EXOSOMES NUCLEIC ACIDS

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

aekuleshova25@gmail.com

Экзосомы — нановезикулы диаметром 40–100 нм, содержащиеся в различных биологических жидкостях. Показано наличие белков, ДНК, мРНК и микроРНК в экзосомах. Присутствие микроРНК в экзосомах свидетельствует об их вовлеченности в межклеточную коммуникацию, что делает экзосомы перспективным объектом

изучения. Экзосомы содержатся в различных биологических жидкостях. Наиболее изученными на данный момент являются экзосомы крови и различных культуральных жидкостей, в то время, как об экзосомах молока известно мало. Поскольку молоко является источником экзосом, доступным в больших объемах, изучение нуклеиновых кислот экзосом молока является актуальной задачей.

Стандартный протокол выделения экзосом включает стадию ультрацентрифугирования, которое позволяет осадить везикулы. С помощью модифицированного протокола, включающего несколько стадий центрифугирования, ультрафильтрацию, ультрацентрифугирование, гель-фильтрацию и аффинную хроматографию, выделены экзосомы из человеческого и лошадиного молока. На основе препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из полученных экзосом, приготовлены библиотеки мРНК, микроРНК и ДНК, которые в дальнейшем были проанализированы с помощью секвенирования нового поколения.

Проведено сравнение нуклеиновых кислот, полученных на разных стадиях выделения экзосом из молока человека и лошади.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-74-10055

**В.А. Куликова^{1,2,3}, А.В. Кропотов¹,
К.Б. Нериновский⁴, А.П. Якимов⁵, С.П. Гамбарян²,
Ю.С. Судницына², М.П. Светлова¹,
Л.В. Соловьева¹, А.А. Никифоров¹**

ИМПОРТ И МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕОЗИДНЫХ ФОРМ ВИТАМИНА В3 КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

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

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

⁵ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

**V.A. Kulikova^{1,2,3}, A.V. Kropotov¹, K.B. Nerinovski⁴,
A.P. Yakimov⁵, S.P. Gambaryan², J.S. Sudnitsyna²,
M.P. Svetlova¹, L.V. Solovjeva¹, A.A. Nikiforov¹**

IMPORT AND METABOLISM OF NUCLEOSIDE FORMS OF VITAMIN B3 IN HUMAN CELLS

¹ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

² Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

³ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

⁴ St. Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

⁵ Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina, Russia

veronika.a.kulikova@gmail.com

Основным способом регуляции уровня никотинамидадениндинуклеотида (NAD) в клетках человека является его биосинтез из поступающих с пищей различных форм витамина В3: никотинамида (Nam) и никотиновой

кислоты (NA), а также рибозида никотинамида (NR) и рибозида никотиновой кислоты (NAR) [1,2].

На сегодняшний день до конца не установлено, каким образом клетки человека импортируют и метаболизируют нуклеозиды NR и NAR. В рамках данной работы мы проверяли гипотезу о том, что переносчики семейств трансмембранных белков ENT (equilibrative nucleoside transporters) и CNT (concentrative nucleoside transporters) [3] могут отвечать за транспорт NR и NAR через плазматическую мембрану.

Для этого мы использовали экспериментальный подход, основанный на фармакологическом ингибировании или сверхэкспрессии белков в клетках человека, с последующей детекцией метаболитов при помощи спектроскопии ЯМР.

Мы установили, что импорт нуклеозида NR в клетки человека опосредуют переносчики ENT1, ENT2 и ENT4. После импорта в клетку нуклеозид NR интенсивно расщепляется до Nam цитозольной пуридиннуклеозидфосфорилазой (PNP), ингибирование которой приводит к подавлению импорта и расщепления NR, а также увеличивает эффективность синтеза внутриклеточного NAD из NR в клетках HEK293, HeLa и в эритроцитах человека.

Также мы показали, что нуклеозид NAR транспортируется в клетки переносчиками ENT1 и ENT2. Эффективность импорта NAR значительно повышается после сверхэкспрессии в клетках никотинамидрибозидкиназы, катализирующей фосфорилирование NAR с образованием мононуклеотида никотиновой кислоты. Более того, мы наблюдали PNP-зависимое расщепление NAR до NA в эритроцитах человека, но не в клетках HEK293.

Таким образом, существенный импорт NR и NAR в клетку наблюдается только в случае, когда данные нуклеозиды эффективно метаболизируют в цитозоле, тогда как расщепление NR и NAR (до Nam и NA) фосфорилазой PNP может являться одним из способов утилизации нуклеозидов для синтеза NAD в клетках человека.

Работа выполнена при поддержке Программы «Молекулярная и клеточная биология и пост-геномные технологии» Президиума РАН и гранта РФФИ № 19-34-60039.

Литература:

1. Nikiforov A., Kulikova V., Ziegler M. 2015. The human NAD metabolome: functions, metabolism and compartmentalization. *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* 50: 284–297.
2. Kulikova V.A., Gromyko D.V., Nikiforov A.A. 2018. The Regulatory Role of NAD in Human and Animal Cells. *Biochemistry (Moscow)*, 83: 800–812.
3. Young J.D., Yao S.Y., Baldwin J.M., Cass C.E., and Baldwin S.A. 2013. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med.* 34: 529–547.

**Т.А. Кургина^{1,2}, М.М. Кутузov¹, К.А. Белоусова¹,
Р.О. Анарбаев¹, С.Н. Ходырева¹, О.И. Лаврик¹**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ PARP1 И PARP2 С ПОВРЕЖДЕНИЯМИ ДНК В КОНТЕКСТЕ НУКЛЕОСОМ

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

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

T.A. Kurgina^{1,2}, M.M. Kutuzov¹, K.A. Belousova¹,
R.O. Anarbaev¹, S.N. Khodyreva¹, O.I. Lavrik¹

THE STUDY OF PARP1 AND PARP2 INTERACTION WITH DNA DAMAGE IN THE NUCLEOSOME CONTEXT

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

t.a.kurgina@gmail.com

Ферменты семейства поли(АДФ-рибозо)полимераз (в частности, PARP1 и PARP2) — регуляторы многих клеточных процессов, в том числе репарации ДНК. Данные ферменты активируются, связываясь с повреждённой ДНК, и катализируют синтез поли(АДФ-рибозы), используя в качестве субстрата NAD⁺. При этом поли(АДФ-рибоза) ковалентно присоединяется к различным белкам. В настоящее время три медицинских препарата одобрены FDA для терапии рака молочной железы в качестве ингибиторов PARP1/2. Так же показано, что PARP1 вовлечён в развитие воспаления [1]. Таким образом, ингибирование активности PARP1 может иметь не только противораковый, но и противовоспалительный эффект. Однако при применении ингибиторов PARP1 может возникнуть устойчивость раковых опухолей к терапии. Кроме того, существующие ингибиторы PARP1 ингибируют также PARP2, что полностью блокирует синтез поли(АДФ-рибозы). Эти проблемы требуют не только разработки новых препаратов-ингибиторов, но и фундаментальных исследований PARP1 и его взаимодействия с другими белками.

Ранее мы разработали тест-систему, которая позволяет анализировать активность PARP1 в режиме реального времени [2]. В данной работе мы модифицировали эту тест-систему для количественного исследования взаимодействия PARP1 и PARP2 с нуклеосомами *in vitro*. Нуклеосома представляет собой ДНК-белковый комплекс, состоящий из 147 п.н. ДНК, «намотанной» на октамер гистонов. В составе нуклеосомы часть оснований ДНК экранирована гистонами, что затрудняет их распознавание ферментами. PARP1 и PARP2 потенциально могут влиять на доступность повреждений в контексте нуклеосомы.

Предложенным методом мы изучили взаимодействие PARP1 и PARP2 с интактной и повреждённой ДНК в составе нуклеосомы. Показана зависимость сродства этих ферментов к нуклеосоме от типа повреждения ДНК и его доступности. Изучено влияние некоторых ингибиторов на активность PARP1 с использованием нуклеосом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-00-00097

Литература:

1. Kunze F.A. et.al. Regulating Immunity via ADP-Ribosylation: Therapeutic Implications and Beyond. Cell Press, 2019
2. Kurgina T.A., et.al. A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity. Anal. Biochem, 2018

В.Н. Лавренова^{1,2}, Е.Н. Графская^{1,3},
Д.А. Широков^{1,4}, П.А. Бобровский¹,
А.М. Белова¹, И.А. Лацис¹, В.Ю. Варламова^{1,2},
М.А. Дмитриева^{1,4}, В.В. Бабенко¹,
В.А. Манувера^{1,3}, В.Н. Лазарев^{1,3}

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА НОВЫХ АНТИСТАЗИН-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

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

³ ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

V.N. Lavrenova^{1,2}, E.N. Graftskaia^{1,3},
D.M. Shirokov^{1,4}, P.A. Bobrovsky¹, A.M. Belova¹,
I.A. Latsis¹, V.Y. Varlamova^{1,2}, M.A. Dmitrieva^{1,4},
V.V. Babenko¹, V.A. Manuvera^{1,3}, V.N. Lazarev^{1,3}

EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL ANTISTASIN-LIKE PROTEINS FROM THE MEDICINAL LEECH

¹ Federal Research Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, School of Biology, Moscow, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

⁴ K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

pkviktor@mail.ru

Антистазины — белки, секретируемые слюнными железами медицинской пиявки для ингибирования системы свёртывания крови человека и других позвоночных животных. Антикоагулянтная активность белков, производимых медицинской пиявкой, уже много лет привлекает внимание учёных и фармакологов, так как является перспективным подходом к терапии тромбозов, тромбофлебитов, постинфарктных и постинсультных состояний, а также некоторых других заболеваний. Однако, традиционная антикоагулянтная терапия зачастую приводит к ряду побочных эффектов, что делает поиск новых антикоагулянтов очень актуальной задачей.

Ранее в нашей лаборатории был отсеквенирован геном и транскриптом медицинской пиявки, по результатам биоинформатического анализа которых были выявлены последовательности 14 антистазин-подобных белков, обладающих потенциальными антикоагулянтными свойствами. Были сконструированы:

- векторы на основе плазмиды pET22b для экспрессии в кишечной палочке
- белков, слитых с полигистидиновой последовательностью,
- белков, слитых также с последовательностью домена белка SlyD *E.coli*;
- векторы на основе pcDNA™3.4 TOPO™ для экспрессии в Expi293

- белков, слитых с полигистидиновой последовательностью,
- белков, слитых также с последовательностью лёгкой цепи иммуноглобулина G.

Для получения очищенных целевых белков проводили металл-афинную хроматографию и обработку TEV-протеиназой с последующей ионообменной хроматографией. Антикоагулянтную активность анализировали по показателям активированного частичного тромбопластинового времени и тромбинового времени. Отобранные по данным тестам белки могут быть перспективными кандидатами для разработки фармацевтических препаратов.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 17-75-20099

**И.К. Литвинов¹, Т.Н. Беляева¹, Е.А. Леонтьева¹,
А.О. Орлова², Е.С. Корнилова^{1,3}**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЗКАДМИЕВЫХ НЕТАРГЕТНЫХ КТ НА ОСНОВЕ ФОСФИДА ИНДИЯ С КЛЕТКАМИ ЛИНИИ A549

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

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

**I.K. Litvinov¹, T.N. Belyaeva¹, E.A. Leontieva¹,
A.O. Orlova², E.S. Kornilova^{1,3}**

THE RESEARCH OF THE INTERACTION OF CADMIUM-FREE NON-TARGETED QDS BASED ON INDIUM PHOSPHIDE WITH A549 LINE CELLS

¹ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences,
Saint-Petersburg, Russia

² ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

³ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic
University, Saint-Petersburg, Russia

lik314@mail.ru

В биологических исследованиях полупроводниковые квантовые точки (КТ) благодаря уникальным фотофизическим характеристикам, являются альтернативой органических люминофоров. В данной работе мы получили репрезентативные данные по взаимодействию InP-КТ с клетками линии A549 с помощью микроскопа Olympus FV3000. Показано, что InP-КТ были локализованы в виде кластеров как внутри клеток, так и на поверхности мембран клеток. Кроме того, КТ были обнаружены вне клеток на подложке. Для оценки состояния КТ в кластерах был проведен анализ кинетики затухания люминесценции КТ с помощью микроскопа MicroTime 100. Времена жизни люминесценции (τ) КТ в клетках оказались меньше, чем вне клеток (порядка 32 и 42 нс, соответственно). Снижение τ объясняется изменением состояния КТ под действием внешних условий. Ясно, что в ходе эндоцитоза КТ попадают в закисленные компартменты, испытывая воздействие изменения уровня pH от 7,4 до 4,2. Было промоделировано воздействие изменения уровня pH на характеристики КТ в растворе PBS. Обнаружено, что квантовый выход люминесценции различается, в зависимости от уровня pH. Влияние pH может объясняться как гашением люминесценции КТ, так и стимулированием их агрегации. Подробный анализ кинетики затухания люминесценции КТ на различных длинах волн (600, 640 и 680 нм) не выявил

значительного образования агрегатов. Поскольку изменения фотофизических характеристик КТ напрямую зависят от целостности структуры КТ и влияния молекул внешнего окружения, можно предположить, что для InP-КТ воздействие ионов H^+ приводит к возникновению дефектных состояний приводящих к нарушению процессов рекомбинации носителей зарядов, и, как следствие, снижению как квантового выхода люминесценции, так и τ КТ. Таким образом, в эндосомах клеток происходит гашение люминесценции КТ. Поэтому понимание возможных искажений данных, основанных только на интенсивности меченных флуорофором клеток без учета природы флуорофора и его реакции на микроокружение, становится чрезвычайно актуальной задачей.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН № 13 «Основы высоких технологий и использование особенностей наноструктур в науках о природе» (проект № 3.1.2), Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00382) и Министерства науки и высшего образования РФ (госзадание № 2019-1080).

**Д.В. Лысикова^{1,2}, В.Ю. Васильева¹,
В.И. Чубинский-Надеждин¹, Ю.А. Негуляев^{1,2},
Е.А. Морачевская¹, А.В. Сударикова¹**

ФУНКЦИОНАЛЬНО-АКТИВНЫЙ КАНАЛ ENAC В МЕМБРАНЕ КЛЕТОК K562 СОДЕРЖИТ δ -СУБЪЕДИНИЦУ

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

**D.V. Lysikova^{1,2}, V.Y. Vasileva¹, V.I. Chubinskiy-
Nadezhdin¹, Yu.A. Negulyaev^{1,2},
E.A. Morachevskaya¹, A.V. Sudarikova¹**

FUNCTIONALLY-ACTIVE ENAC CHANNEL IN THE MEMBRANE OF K562 CELLS CONTAINS δ -SUBUNIT

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

² St. Petersburg Polytechnic University of Peter the
Great, Saint-Petersburg, Russia

darya25198@gmail.com

Потенциал-независимые натриевые каналы идентифицированы как один из основных путей входа натрия, определяющих быстрые изменения натриевой проницаемости в трансформированных клетках крови. Натриевые каналы в клетках миелоидной лейкемии человека K562 были названы «актин-управляемыми» на основании внутриклеточного механизма их активации и инактивации. По своим физиологическим характеристикам они близки к каналам семейства ENaC, за исключением чувствительности к ингибитору амилориду. Недавно обнаруженная внеклеточная активация актин-управляемых каналов при наружном приложении сериновой протеазы трипсина подтверждает принадлежность исследуемых каналов к семейству ENaC. Ранее сообщалось, что каналы ENaC, содержащиеся в своем комплексе δ -субъединицу вместо α -ENaC, обладают сниженной чувствительностью к амилориду. Целью работы являлось изучение возможного участия δ -субъединицы ENaC в составе функционально-активного натриевого канала в клетках K562.

В первой серии экспериментов предполагаемое участие δ -ENaC в формировании натриевого канала

в клетках K562 было проверено в опытах с использованием трипсина (5 мкг/мл) в качестве внеклеточного активатора. В конфигурации whole-cell метода патч-кламп регистрировали трипсин-активируемые токи через одиночные каналы в Na^+ - или Li^+ -содержащем наружном растворе. Проводимость каналов для Li^+ (145 мМ) снижена по сравнению с Na^+ (145 мМ) и составила 10 и 15.5 пСм, соответственно. Эта особенность является основным биофизическим признаком ENaC, содержащих в своем комплексе δ -субъединицу. Результаты ОТ-ПЦР анализа и иммунофлуоресцентного окрашивания также подтвердили экспрессию δ -hENaC (наряду с α -, β -, γ -ENaC) на уровне мРНК и белка в клетках K562.

В экспериментах whole-cell впервые было обнаружено, что подача во внеклеточный раствор капсазепина (1–5 мкМ), активатора δ -ENaC, вызывала активацию натриевых каналов с типичными характеристиками; проводимость каналов составила около 15 пСм. Биофизические характеристики каналов, активированных капсазепином, совпадали с характеристиками каналов, активируемых при разборке цитоскелета (Цитохалазин Д, 10 мкг/мл) или при действии трипсина. Аналогично, при замене Na^+ -содержащего раствора в камере на Li^+ -содержащий наблюдали уменьшение амплитуды токов — проводимость снижалась до 10–11 пСм. Мы установили, что после замены ионов Na^+ на Li^+ снижалась амплитуда открытого состояния только части каналов, активированных ЦитД. Кроме того, при разборке цитоскелета или действии протеазы активацию каналов наблюдали в 100% экспериментов whole-cell (для ЦитД $n=15$), а при действии капсазепина — в 33% ($n=18$). Полученные результаты дают аргументы в пользу того, что в мембране клеток K562 присутствуют две популяции функционально-активных каналов ENaC с разным субъединичным составом: $\alpha\beta\gamma$ - и $\delta\beta\gamma$ -ENaC.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 19-015-00211.

И.С. Малахов¹, И.В. Смирнов¹,
О.А. Шашкова¹, С.В. Шатик¹, Л.А. Терехина¹,
Н.Л. Вартанян¹, М.П. Самойлович¹

АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕЧЕНИЯ РАДИОНУКЛИДАМИ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ ЭНДОГЛИНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЕГО КОНСТАНТНОГО УЧАСТКА

¹ ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России

I.S. Malakhov¹, I.V. Smirnov¹,
O.A. Shashkova¹, S.V. Shatik¹, L.A. Terechina¹,
N.L. Vartanian¹, M.P. Samoylovich¹

DEPENDENCE OF ANTIGEN-BINDING ACTIVITY AND EFFICIENCY OF RADIONUCLIDES LABELING OF ANTIENDOGLIN MONOCLONAL ANTIBODY UPON ITS CONSTANT REGION

¹ Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technology named after acad. A.M. Granov, Ministry of Health of the Russian Federation

ipaty.malakhov@yahoo.com

Для диагностирования и терапии онкологических заболеваний перспективным представляется

использование конъюгатов моноклональных антител (МКАТ) с короткоживущими радионуклидами. МКАТ, получаемые гибридной технологией, при введении человеку индуцируют иммунный ответ. Создание химер из переменных частей мышинового АТ и константных участков человеческого иммуноглобулина — начальный этап гуманизации АТ. Существуют данные, что Fc-фрагмент антитела влияет на специфичность и константу связывания антитела с антигеном [1]. Последовательность и пространственная доступность аминокислотных остатков, во многом определяемые константными участками АТ, влияют на эффективность конъюгации АТ с хелаторами и, соответственно, эффективность мечения АТ изотопами.

Нами была создана [2] панель МКАТ против эндоглина человека, маркера эндотелия вновь образующихся сосудов. Для работы было отобрано одно из полученных АТ, 2С8, с изотипом IgG2b, связывающееся с конформационным эпитопом, позволяющее выявлять мембранную и растворимую формы эндоглина. АТ распознаёт эндоглин и человека, и крысы, что позволяет использовать крысиные модели при тестировании получаемых на его основе препаратов.

Определена последовательность антигенсвязывающих участков антитела, созданы две плазмиды. Одна из плазмид кодирует легкую цепь, состоящую из V_L участка легкой цепи 2С8 и C_L участка к цепи человека. Вторая плазида кодирует тяжелую цепь, состоящую из V_H участка H цепи 2С8 и C_H участка $\gamma 2$ цепи человека. Проведены эксперименты по определению наиболее эффективного для трансфекции линии НЕК293 соотношения данных плазмид. Получен препарат, содержащий химерное АТ 2С8 изотипа IgG2.

Идёт работа по созданию на основе 2С8 химерных АТ изотипов IgG1 и IgG4 человека и сравнению их с исходным АТ изотипа IgG2b.

Полученные препараты АТ, различающихся по изотипу, будут сравниваться по эффективности мечения изотопами металлов, сохранению антигенсвязывающей активности.

Результатами работы будут данные по влиянию изотипа на следующие параметры: влияние на аффинитет, эффективность мечения выбранными радиоизотопами, устойчивость к процедуре мечения, иммуноэффекторные свойства. Полученная информация позволит выбрать наиболее подходящий изотип АТ для создания радиофармпрепаратов, предназначенных для выявления очагов ангиогенеза.

Литература:

1. Torre M. and Casadevall A. The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity. Trends in immunology 2008; 29(2): 91–7.
2. Smirnov I.V., Gryazeva I.V., Samoylovich M.P. et al. Different pairs of monoclonal antibodies detect variable amounts of soluble endoglin in human blood plasma. Immunochem Immunopathol 2016; 2(121).

**Н.М. Мельникова, Ю.Д. Диордиенко,
М.И. Сулацкий, А.И. Сулацкая**
**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ
АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ
БЕТА-АМИЛОИДОВ С РАЗЛИЧНОЙ ДЛИНОЙ
АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

**N.M. Melnikova, Yu.D. Diordienko,
M.I. Sulatsky, A.I. Sulatskaya**

**A COMPARATIVE STUDY OF AMYLOID
FIBRILS FORMED FROM BETA-AMYLOIDS
WITH DIFFERENT LENGTH OF AMINO ACID
SEQUENCE**

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences,
Saint-Petersburg, Russia*

melnikova07nm@gmail.com

Накопление в организме человека упорядоченных белковых агрегатов, амилоидных фибрилл, может являться маркером ряда тяжелых нейродегенеративных заболеваний. В частности, бета-амилоид, состоящий из 42 аминокислотных остатков (A β 42), является основным компонентом амилоидных бляшек, накапливающихся в организме пациентов с болезнью Альцгеймера. Однако существуют и другие варианты этого пептида, образующиеся в норме из трансмембранного белка—предшественника бета-амилоида (APP). Одним из них является пептид, состоящий из 40 аминокислотных остатков и не имеющий патогенных свойств (A β 40). Целью настоящей работы стало изучение полиморфизма амилоидных фибрилл на основе A β 40 и A β 42, для чего были проанализированы их морфология, собственные фотофизические характеристики, вторичная структура, а также их взаимодействие с амилоид-специфическим флуоресцентным зондом тиофлавином Т (ThT).

С использованием литературных данных была подобрана эффективная методика получения амилоидных фибрилл, основанная на инкубировании бета-амилоидов в 50% гексафторизопропанол (HFIP) с последующим удалением растворителя из образца. Для изучения полученных амилоидных фибрилл был использован широкий спектр физико-химических методов, таких как электронная микроскопия, КД-спектроскопия, а также абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия, которые, в частности, были применены для исследования растворов фибрилл с ThT, подготовленных методом равновесного микродиализа.

Показано, что в процессе фибриллогенеза происходит изменение структуры бета-амилоидов с увеличением содержания бета-складчатых областей. Было сделано заключение о более высоком содержании бета-листов в зрелых амилоидных фибриллах на основе A β 42 по сравнению с фибриллами на основе A β 40. Оказалось, что фибриллы на основе A β 40 образуют отдельные тонкие нити, практически не взаимодействующие между собой, а волокна фибрилл на основе A β 42 в тех же условиях имеют склонность к образованию кластеров. Показано, что в фибриллах на основе A β 40 существует один тип связывания ThT, а в фибриллах на основе A β 42 существует еще одна мода связывания красителя, что обусловлено способностью этих фибриллярных волокон к кластеризации.

В результате выполнения работы было сделано заключение о том, что даже небольшие изменения в аминокислотной последовательности белков и пептидов (как

в случае A β 40 и A β 42) могут приводить к полиморфизму амилоидных фибрилл на их основе. При этом анализ полученных результатов и литературных данных показал, что белки с различной аминокислотной последовательностью могут образовывать сходные по физико-химическим характеристикам амилоидные фибриллы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Стипендии Президента РФ СП-841.2018.4 и гранта РФФИ № 16-04-01614.

**Е.Д. Милешина^{1,2}, О.В. Серова¹,
А.С. Горященко¹, А.А. Ганцова¹,
А.А. Можяев¹, И.Е. Деев¹, А.Г. Петренко¹**

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ
АНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЕ
IRR**

¹ *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

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

**E.D. Mileshina^{1,2}, O.V. Serova¹,
A.S. Goryashchenko¹, A.A. Gantsova¹,
A.A. Mozhaev¹, I.E. Deev¹, A.G. Petrenko¹**

**OBTAINING AND IMMUNOCHEMICAL
CHARACTERIZATION OF POLYCLONAL
ANTIBODIES TO IRR RECEPTOR TYROSINE
KINASE**

¹ *Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Bioorganic Chemistry named after Academicians M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov RAS, Moscow, Russia*

² *D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Moscow, Russia*

e_mileshina@mail.ru

Рецептор, подобный инсулиновому рецептору IRR (insulin receptor-related receptor) принадлежит к подсемейству инсулиновых рецепторов [1]. Нами впервые было показано, что IRR является единственной известной на сегодняшний день рецепторной тирозинкиназой — сенсором внеклеточной щелочной среды и участвует в регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме. Данный рецептор активируется при защелачивании внеклеточной среды выше pH 7.9, имеет точку 50% эффекта примерно pH 8.5 и выходит на насыщение при pH свыше 9.0. Активация IRR приводит к фосфорилированию каскадных внутриклеточных белков IRS-1 и АКТ, и приводит к перестройке клеточного цитоскелета [2].

Цель настоящей работы — получить и охарактеризовать поликлональные антитела (ПА) к IRR для изучения его структуры и функций в физиологических экспериментах.

Для получения антител получена плазмида pET28a-hIRR-C со всеми необходимыми элементами для успешной экспрессии С-концевой участка IRR в клетках *E. coli*. Разработана система экспрессии и очистки целевого белка. Проведена иммунизация кроликов антигеном до достижения стойкого иммунного ответа.

В результате нами получена сыворотка крови с ПА против С-концевого участка IRR. Антитела

охарактеризованы иммунохимическими методами: вестерн блот, иммуноцитохимия и иммунопреципитация. Оценка антител показала, что антитела а-с-hIRR-k1 способны специфично связываться с IRR человека и мыши, а антитела а-с-hIRR-k2 специфичны ко всем рецепторам из семейства рецептора инсулина.

Получение антител к IRR для проведения структурно-функциональных исследований, представляет особый интерес для изучения фундаментальных основ механизма щелочной чувствительности, а также для развития в будущем новых терапевтических подходов, созданию лекарств для лечения заболеваний, связанных с нарушением кислотно-щелочного равновесия и некоторых форм рака.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 20-04-00959, № 19-34-51034, № 19-04-00815, № 17-00-00486, № 17-00-00489 (К), № 19-34-90177, № 19-04-01042.

А.А. Нижников

БИОЛОГИЧЕСКИЕ РОЛИ И ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ АМИЛОИДОГЕНЕЗА У ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ

Лаборатория протеомики надорганизменных систем, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ), Санкт-Петербург, г. Пушкин Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ), Санкт-Петербург

A.A. Nizhnikov

BIOLOGICAL ROLES AND PATHOLOGICAL CONSEQUENCES OF AMYLOIDOGENESIS IN PROKARYOTES AND EUKARYOTES

Laboratory of Supraorganism Systems Proteomics, All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Pushkin, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg

lab7@arriam.ru

Амилоидами называют фибриллярные белковые агрегаты, обладающие уникальной упорядоченной пространственной структурой, называемой «кросс-бета». На протяжении длительного времени эти фибриллы изучали в связи с их патологической ролью. Так, заболевания, вызываемые патологической амилоидной агрегацией различных белков, называемые амилоидозами, известны начиная с XVII века, однако их белковая природа была установлена значительно позднее. На сегодняшний день известно около пятидесяти амилоидозов, все они неизлечимы, могут быть первичными или вторичными по характеру возникновения, поражать отдельные органы или же иметь системный характер. Особую группу представляют нейродегенеративные заболевания, вызываемые патологической агрегацией белков, среди которых есть и инфекционные, вызываемые особой группой амилоидов — прионами. Начиная с 2000 года происходит переосмысление биологических ролей амилоидов, поскольку было выявлено значительное число белков, которые образуют амилоиды в норме, и эти амилоиды выполняют жизненно-важные биологические функции. Подобные амилоиды, называемые функциональными, были обнаружены у архей, бактерий и эукариот. В настоящее время число идентифицированных у различных организмов функциональных амилоидов превысило число

патологических. Репертуар их функций крайне разнообразен, так у бактерий функциональные амилоиды вовлечены в формирование биопленок, запасание токсинов, образование белковых оболочек, обеспечение преодоления поверхностного натяжения и другие функции. Повидимому, роль амилоидов в вирулентности прокариот и взаимодействиях «патоген-хозяин» и «симбионт-хозяин» крайне широка, и в настоящий момент идентифицированные амилоиды, вовлеченные в вирулентность бактерий, представляют собой лишь верхушку айсберга. Вместе с тем, уже сейчас очевидно, что бактериальные амилоиды являются «темной», малоисследованной стороной мира патологических для человека амилоидов, так как, по данным Всемирной организации здравоохранения, до 80 процентов болезнетворных бактериальных штаммов образуют биопленки, ассоциированные с вирулентностью и патологическими свойствами этих микроорганизмов, а биопленки, в свою очередь, в качестве ключевого структурного элемента содержат амилоидные фибриллы. В настоящем докладе будет проведен обзор структурных особенностей амилоидных фибрилл, разнообразия их патологических свойств и биологических функций у прокариот и эукариот, освещены последние данные, полученные нашим исследовательским коллективом, совместно с ИИЦ РАН, о функциональных амилоидах симбиотических бактерий и роли амилоидогенеза в запасании белка семян у наземных растений.

Исследование амилоидных белков растений и симбиотических бактерий выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда 17-16-01100, изучение прионов дрожжей проведено при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 16-34-60153.

**К.Г. Павлова¹, Н.Ю. Шилиягина¹,
А.Б. Воловецкий¹, А.Б. Костюк¹, А.Г. Орлова²**

ОЦЕНКА УРОВНЯ ОКСИГЕНАЦИИ НОВООБРАЗОВАНИЙ МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ ДИФфуЗИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И ИММУНОГИСТОХИМИИ

¹ *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород*

² *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики Российской академии наук», Нижний Новгород*

**K.G. Pavlova¹, N.Y. Shilyagina¹, A.B. Volovetsky¹,
A.B. Kostyuk¹, A.G. Orlova²**

ESTIMATION OF THE OXYGENATION LEVEL OF MALIGNANT NEOPLASMS BY THE METHODS OF OPTICAL DIFFUSION SPECTROSCOPY AND IMMUNOGISTOCHEMISTRY

¹ *N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 603000 Gagarin Avenue, 23, Nizhny Novgorod, Russia*

² *Federal Research Center Institute of Applied Physics Russian Academy of Sciences, 46 Ulyanov Str., 603950 Nizhny Novgorod, Russia*

780pavlova@gmail.com

Кровеносное русло опухолевой ткани имеет ряд морфологических особенностей, которые обуславливают недостаток кислорода в тканях — гипоксию. Аномалии сосудистого русла опухоли определяют ограничения доставки лекарственных средств и снижение эффективности лучевых видов лечения. Определение уровня оксигенации новообразований до начала лечения может стать инструментом для подбора оптимального способа терапии.

Метод оптической диффузионной спектроскопии (ОДС) позволяет неинвазивно оценить содержание основных биологических хромофоров — дезокси- (Hb), оксигемоглобина (HbO₂), воды и липидов. На основе соотношений их концентраций можно оценить содержание кислорода в тканях. Для подтверждения полученных данных ОДС был использован метод иммуногистохимического (ИГХ) анализа с маркером гипоксии пимонидазолом, который накапливается в участках тканей с парциальным давлением кислорода менее 10 мм рт.ст. Целью работы было исследование изменения содержания гемоглобина и уровня оксигенации экспериментальных опухолей в различные сроки их роста методом ОДС и ИГХ.

В исследовании было использовано 5 мышей линии balb/c с привитой опухолью СТ26 (карцинома кишечника мыши). Эксперимент начинали через 7 дней с момента введения опухолевых клеток. Спектры ОДС снимали на 7, 10 и 14 дни. Регистрация проводилась установкой для спектроскопии обратного рассеяния с оптическим зондом. В качестве источника использована галогеновая лампа MCWHF2, спектр излучения регистрируется спектрометром QE65000 (Ocean Optics Inc, США). Сатурацию крови определяли из соотношения парциальных вкладов концентраций биологических хромофоров в спектрах коэффициента поглощения и транспортного коэффициента рассеяния.

Пимонидазол вводили внутривенно на 7 и 14 сутки роста опухоли в дозе 60 мг/кг. Через 45 минут животных умерщвляли, изготавливали криосрезы опухолевой ткани толщиной 7 мкм. Срезы окрашивали с использованием антител к пимонидазолу, конъюгированных с ФИТЦ. Зоны флуоресценции ФИТЦ определяли на лазерном сканирующем микроскопе Carl Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Относительную гипоксическую фракцию рассчитывали как процент пимонидазол-положительных зон от общей площади образца.

В ходе эксперимента объем экспериментальных опухолей увеличился в среднем в 8,7 раз. Показатели кровенаполнения (уровень tHb), дезоксигемоглобина изменились незначительно, а оксигенация опухолевой ткани снизилась с 35,37% до 1,17%. Это объясняется существенным падением содержания HbO₂. Предполагается, что основная причина изменения содержания кислорода СТ26 — неспособность опухолевой сосудистой сети полноценно обеспечить быстрорастущую ткань кислородом. Методом ИГХ по мере роста опухолевого узла выявлено увеличение относительной гипоксической фракции (с 7,58% по 36,84%), что демонстрирует существенное повышение площади зон гипоксии и подтверждает результаты ОДС.

Н.Н. Пескова¹, А.А. Горохова¹, Н.Ю. Шилиягина¹,
А.Б. Костюк¹, С.А. Лермонтова², Л.Г. Клапшина²,
А.А. Брилкина¹, И.В. Балалаева¹

ВТОРИЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И ИЗМЕНЕНИЕ ВЯЗКОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ОТВЕТ НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

¹ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

² Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН, Нижний Новгород, Россия

N.N. Peskova¹, A.A. Gorokhova¹, N.Y. Shilyagina¹,
A.B. Kostuk¹, S.A. Lermontova², L.G. Klapshina²,
A.A. Briilkina¹, I.V. Balalaeva¹

SECONDARY H₂O₂ ACCUMULATION AND VISCOSITY CHANGES IN CANCER CELLS INDUCED BY PHOTODYNAMIC TREATMENT

¹ National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhni Novgorod, Russia

² G.A. Razuvaev Institute of Organometallic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Nizhni Novgorod, Russia

nin-22@yandex.ru

Фотодинамическая терапия (ФДТ) — метод диагностики и лечения злокачественных новообразований, основанный на избирательном накоплении в опухолевой ткани фотосенсибилизатора (ФС), способного по локальному воздействию света с длиной волны, соответствующей его максимуму поглощения, генерировать цитотоксические агенты, вызывающие гибель опухолевых клеток. Несмотря на широкое применение, механизм ответа клетки на фотодинамическое воздействие до конца не изучен.

Цель данной работы — сопоставление характерных времен изменения вязкостных свойств клеток, накопления пероксида водорода и развития клеточной смерти при фотодинамическом воздействии.

Исследования проводились на культуре клеток эпидермоидной карциномы человека A431 и ее производных — стабильно трансфицированных клеточных линиях, экспрессирующих флуоресцентный белок HyPer в цитоплазме (A431 HyPer-cyto) и митохондриях (A431 HyPer-mito) клеток. Спектр возбуждения флуоресценции HyPer чувствителен к содержанию H₂O₂, что может быть использовано для ратиометрического определения концентрации последнего. В качестве параметра, характеризующего содержание пероксида водорода, нами определялось отношение регистрируемого сигнала флуоресценции HyPer при разных длинах волн возбуждения (I₄₈₈/I₄₀₅). В качестве ФС в работе использовалось соединение из класса порфиразинов — тетракис(бензилоксибензил)тетрацианопорфиразин (далее Pz). Используемое соединение имеет уникальное сочетание свойств ФС и сенсора вязкости, что позволяет сопоставлять динамику ответа H₂O₂ с параметрами вязкости микроокружения в клетке.

Зарегистрирована локализация Pz в основном в ЭПР и аппарате Гольджи. Показано, что изменения вязкости, регистрируемые по времени жизни возбужденного состояния Pz, наблюдались уже через 5 мин после облучения. ФД воздействие приводило к увеличению содержания H₂O₂ как в цитоплазме, так и в митохондриях облученных клеток. Рост содержания H₂O₂ в течение сравнительно длительного времени после облучения позволяет

говорить о его продукции в ходе вторичных процессов, развивающихся как следствие ФД воздействия. В цитоплазме увеличение концентрации H_2O_2 зарегистрировано на 15–20 минут позже, чем в митохондриях. Анализ клеточной гибели показал, что нарушение целостности плазматической мембраны наблюдается не ранее чем через 50–60 минут, что существенно позже времени наблюдаемого накопления H_2O_2 .

Мы предполагаем, что первичная продукция активных форм кислорода в ходе облучения вызывает нарушение физических свойств мембран и денатурацию ряда белков, что приводит к регистрируемому увеличению вязкости. Как следствие, нарушается работа ЭТЦ и белковых комплексов, ответственных за вторичную продукцию АФК, которая, в конечном итоге, может приводить к клеточной смерти.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-44-520010).

**О.А. Ракитина¹, М.В. Зиновьева², Д.А. Дидыч²,
В.К. Потапов², А.И. Кузьмич^{2,3}**

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НАЦЕЛЕННОГО НА ОПУХОЛЕВУЮ СТРОМУ ГИСТОНОГО НОСИТЕЛЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

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

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

³ *Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

**O.A. Rakitina¹, M.V. Zinovyeva², D.A. Didych²,
V.K. Potapov², A.I. Kuzmich^{2,3}**

STUDYING EFFICIENCY OF HISTONE-BASED PLASMID DNA CARRIER TARGETED INTO TUMOUR STROMA

¹ *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

² *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, Moscow, Russia*

³ *Institute of Molecular Genetics, RAS, Moscow, Russia*

rakitinaolga97@gmail.com

Перспективной мишенью противоопухолевой генной терапии являются опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ). Один из поверхностных маркеров ОАФ — рецептор фактора роста тромбоцитов бета-типа PDGFRb. Пептидный лиганд YG2 способен связываться с поверхностью PDGFRb-позитивных клеток и накапливаться внутри них. Человеческий гистон H2A способен осуществлять доставку плазмидной ДНК в различные клетки млекопитающих. Мы предположили, что слияние гистона H2A с YG2 способно улучшить эффективность доставки ДНК в ОАФ. Целью данной работы были получение рекомбинантного гистона H2A, слитого с лигандом к PDGFRb, и оценка его трансфицирующих свойств.

В ходе работы новый рекомбинантный белок H2A-YG2 наработан в бактериальной системе, выделен и очищен в два этапа с помощью ионообменной и обращено-фазовой ВЭЖ хроматографий. Выход очищенного белка составлял около 8,5 мг на литр культуры, чистота не менее 90%. Путем измерения подвижности ДНК в агарозном геле показано, что H2A-YG2 способен связывать плазмидную

ДНК не хуже, чем гистон H2A. На PDGFRb-позитивной и негативной линиях клеток была оценена интернализация комплексов гистонов H2A и H2A-YG2 с флуоромеченной плазмидной ДНК. В случае PDGFRb-позитивной линии клеток NIH/3T3, суммарное количество захваченных клетками комплексов увеличивалось в 1,5 раза при использовании модифицированного гистона, однако, доля захвативших комплексы клеток не увеличивалась. При этом модификация не влияла на интернализацию комплексов в случае PDGFRb-негативной линии HEK293T. При трансфекции клеток линии NIH/3T3 комплексами гистонов с кодирующей два репортерных белка плазмидой pCMV-EGFP-P2A-luc2 наблюдалось увеличение активности люциферазы luc2 в лизатах клеток в 5 раз при модификации гистона лигандом к PDGFRb, в то время как для HEK293T значимые изменения не детектировались. Также с помощью проточной цитометрии было выяснено, что доля трансфицированных клеток в случае NIH/3T3 увеличивалась в 3,1 раза при внесении в H2A пептидной модификации, а суммарная флуоресценция EGFP увеличивалась в 7 раз. В то же время, для HEK 293T наблюдалось увеличение доли и суммарной флуоресценции при использовании H2A-YG2, однако, это увеличение было менее выражено, чем для NIH/3T3 (доля увеличивалась в 2,5 раза, а флуоресценция — в 2,6 раз).

Таким образом, нам удалось получить новый рекомбинантный гистон H2A-YG2 и показать, что введенная пептидная модификация приводит к улучшению трансфицирующих свойств гистона H2A в случае как PDGFRb-позитивных, так и PDGFRb-негативных клеток, однако, такое улучшение было существенно более выражено для PDGFRb-позитивной линии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00852.

Е.С. Селиверстов¹, Е.В. Зубарева¹, С.В. Надеждин¹ ВЛИЯНИЕ СТАТИЧЕСКОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА КЛЕТКИ HELA ПРИ РАЗНОМ ВРЕМЕНИ ЭКСПОЗИЦИИ

¹ *Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия*

E.S. Seliverstov¹, E.V. Zubareva¹, S.V. Nadezhdin¹ INFLUENCE OF THE STATIC MAGNETIC FIELD ON HELA CELLS AT DIFFERENT EXPOSURE TIMES

¹ *Belgorod National Research University, Belgorod, Russia*

zubareva@bsu.edu.ru

Вопрос воздействия магнитных полей на биологические объекты до сих пор остаётся открытым [1]. Целью исследования явилось изучение влияния статического магнитного поля (СМП) интенсивностью 80 мТл на клетки HeLa при разном времени экспозиции.

Для генерации СМП использовали неодимовые (NdFeB) магниты (30x3 мм; 80 мТл). Чашки Петри диаметром 30 мм и 96-луночные планшеты с клетками располагали на магнитах и помещали в CO₂-инкубатор. Контролем служили чашки Петри и планшеты с клетками, не подвергавшимися воздействию СМП.

Для исследования метаболической активности клеток HeLa использовали МТТ-тест спустя 3 и 7 суток культивирования; функциональную активность митохондрий

определяли с помощью MitoTracker Red CMXRos спустя 4 и 8 суток. Интенсивность флуоресценции митохондрий измеряли с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon C1, и обрабатывали в программном обеспечении EZ-C1. Для статистического анализа полученных данных использовали U-критерий Манна-Уитни.

По результатам МТТ-теста было показано, что воздействие СМП интенсивностью 80 мТл в течение 3 суток снижало жизнеспособность клеток по сравнению с контролем на 26,5% ($p < 0,01$), в то время как экспозиция в течение недели, напротив, повышала её на 10% ($p < 0,05$). Интенсивность флуоресценции митохондрий контрольной группы клеток составляла $1085,0 \pm 22,6$ у.е. После экспозиции в течение 4 суток на магнитах интенсивность 80 мТл интенсивность флуоресценции митохондрий увеличивалась на 27,7% ($p < 0,01$). Интенсивность флуоресценции митохондрий после экспозиции клеток на магнитах в течение 8 суток не имела достоверных различий по сравнению с контролем.

Наблюдаемые эффекты непродолжительной экспозиции (в течение 3–4 дней) в присутствии СМП могут свидетельствовать об окислительном стрессе [2]. Тогда как увеличение времени экспозиции до 7–8 дней, возможно, приводит к формированию адаптационных реакций к воздействию СМП на клеточном уровне, что требует дальнейшего изучения.

Литература:

1. Бинги В.Н., Савин А.В. Физические проблемы действия слабых магнитных полей на биологические системы. Успехи физических наук. 2003; 173(3): 265–300.
2. Wang H., Zhang X. Magnetic fields and reactive oxygen species. International Journal of Molecular Sciences. 2017; 18(10): 1–20.

**А.Ю. Сидоров^{1,2}, Л.В. Бедулева^{1,2},
И.В. Меньшиков^{1,2}, А.С. Терентьев^{1,2}**

**ПОЛУЧЕНИЕ КОНФОРМЕРОВ
Fc ФРАГМЕНТОВ IGG ЧЕЛОВЕКА,
НЕСУЩИХ НЕОЭПИТОПЫ,
РАСПОЗНАВАЕМЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫМ
РЕВМАТОИДНЫМ ФАКТОРОМ, ПРИ
ПОМОЩИ ИММОБИЛИЗОВАННОГО
ТИОЛСОДЕРЖАЩЕГО БЕЛКОВОГО
КОМПЛЕКСА**

¹ Удмуртский федеральный исследовательский центр уральского отделения РАН, Ижевск, Россия

² Удмуртский государственный университет, Ижевск, Россия

**A. Sidorov^{1,2}, L. Beduleva^{1,2},
I. Menshikov^{1,2}, A. Terentiev^{1,2}**

**OBTAINING CONFORMERS FC FRAGMENTS
OF HUMAN IGG CARRYING NEOEPITOPS
RECOGNIZED BY A REGULATORY RHEUMATOID
FACTOR BY USING AN IMMOBILIZED
THIOL CONTAINING PROTEIN COMPLEX**

¹ Udmurt federal research center Ural branch the Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russia

² Udmurt state university, Izhevsk, Russia

aneck4@rambler.ru

Ранее мы показали, что конформеры Fc фрагментов IgG человека могут экспонировать иммуносупрессивные неоэпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, подавляющим аутоиммунные реакции [1].

Было установлено, что формирование данных неоэпитопов на Fc фрагментах IgG человека происходит под действием тиолсодержащего белкового комплекса (модификатора), удаление которого ведет к утрате неоэпитопов. Так как модификатор включает в состав гетерогенные белки, использование конформеров Fc фрагментов IgG человека в качестве действующего начала вакцины для лечения аутоиммунных заболеваний в смеси с модификатором может вызвать нежелательные иммунные реакции. Поэтому целью исследования было получить иммобилизованный на твердый инертный носитель тиолсодержащий белковый комплекс, вызывающий формирование иммуносупрессивных неоэпитопов на Fc фрагментах IgG человека.

Нами разработан метод иммобилизации тиолсодержащего белкового комплекса на агарозную матрицу. Иммобилизованная форма модификатора вызывает формирование на Fc фрагментах IgG человека неоэпитопов, распознаваемых регуляторным ревматоидным фактором. Методом электрофореза в ПААГ установлено, что образцы Fc фрагментов IgG человека, обработанные иммобилизованным модификатором, не содержат в составе примесей белков и, следовательно, не требуют дополнительной очистки.

Работа поддержана Стипендией президента РФ молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2018), проект СП-1630.2018.4. Работа выполнена при поддержке Министерства Науки и Высшего Образования Российской Федерации, государственный номер 075-00232-20-01, номер проекта 0827-2020-0012.

Литература:

1. Sidorov A., Beduleva L., Menshikov I. et al. Int J Biol Macromol. 2017. 95:938-945. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.081.

**В.Ф. Смирнова¹, И.О. Гаврилюк¹, Д.М. Дарвиш²,
М.Ю. Сироткина², С.В. Чурашов¹,
О.И. Александрова², В.Ф. Черныш¹,
М.И. Блинова², А.Н. Куликов¹**

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОДЕГРАДАЦИИ
КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИХ ГЕЛЕЙ**

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

² Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

**V.F. Smirnova¹, I.O. Gavriluk¹, D.M. Darvish²,
M.U. Sirotkina², S.V. Churashov¹, O.I. Alexandrova²,
V.F. Chernysh¹, M.I. Blinova², A.N. Kulikov¹**

**RESEARCH OF BIODEGRADATION
OF COLLAGEN-CONTAINING GELS**

¹ Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Saint-Petersburg

² Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg

sm_valeria@mail.ru

Зрительная реабилитация пациентов с тотальными сосудистыми помутнениями является перспективной областью офтальмологии. Для этого с успехом применяется трансплантация культивированных эпителиальных стволовых клеток. Одним из возможных вариантов точных носителей является коллагеновый гель. Однако, к существенным недостаткам такого геля можно отнести

его малое время биодegradации. В связи с этим, поиск коллагеновых композиций с увеличенным временем биодegradации является весьма перспективным.

Целью данной работы являлся анализ дegradации *in vivo* коллагеновых гелей, модифицированных гиалуроновой кислотой (ГК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Проведено две серии экспериментальных исследований *in vivo*. Исследование выполнено на 10 половозрелых кроликах (20 глаз) породы шиншилла. Экспериментальным животным предварительно выполняли временную блефарорафию с герметизирующей целью, после чего в конъюнктивальную полость имплантировали коллагеновый гель.

В I серии в 1-ой группе в конъюнктивальную полость имплантировали коллагеновый гель (4 мг/мл) без ГК, а во 2-ой группе — коллагеновый гель (4 мг/мл), содержащий 18% ГК от общего объема геля.

Во II серии в 1-ой группе в конъюнктивальную полость имплантировали коллагеновый гель (4 мг/мл), содержащий 18% ГК, а во 2-ой группе — коллагеновый гель (4 мг/мл), содержащий 9% ГК.

Результаты

I серия. В 1 группе через 24 ч определялась частичная дegradация имплантированного геля. В конъюнктивальных полостях глаз этой группы обнаруживался мягкий обезвоженный коллагеновый каркас. Во 2-й группе — плотные обезвоженные нити коллагенового геля.

II серия. В 1 группе, спустя 24 ч, в конъюнктивальной полости определялись плотные нитчатые обезвоженные остатки коллагенового геля, а во 2 группе — сохраненный коллагеновый гель. Биодegradация коллагенового геля, содержащего 9% ГК, происходит более длительно, чем геля, содержащего 18% ГК. Слишком большое количество ГК приводит к формированию слишком рыхлой структуры геля, что негативно сказывается на времени биодegradации.

Выводы:

- Введение ГК в структуру коллагенового геля приводит к увеличению времени его биодegradации *in vivo*.
- Оптимальное содержание ГК по результатам эксперимента составляет 9% от общего объема геля.
- Гели с большим содержанием ГК имеют слишком рыхлую структуру и дegradируют быстрее.

А.С. Согомонян^{1,2}, В.О. Шипунова^{1,2}, С.М. Деев^{1,2}

БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОАГЕНТЫ КАК СРЕДСТВА ДОСТАВКИ К HER2-СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИМ РАКОВЫМ КЛЕТКАМ

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

² Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

A.S. Sogomonyan^{1,2}, V.O. Shipunova^{1,2}, S.M. Deyev^{1,2}

BIODEGRADABLE POLYMER NANOAGENTS AS DELIVERY VEHICLES FOR HER2 OVEREXPRESSION CANCER CELLS

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

² National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

annasogomonyan2012@mail.ru

Использование биоразлагаемого и биосовместимого полимера поли-лактид-ко-гликолида (PLGA) в качестве носителя лекарственных препаратов привлекает внимание исследователей современной биомедицины, поскольку обеспечивает устойчивое и контролируемое высвобождение соединения, тем самым снижая побочные эффекты. Продуктами распада PLGA являются молочная кислота и гликолевая кислота, которые нетоксичны, биосовместимы и быстро метаболизируются в организме человека. Известно, что анионный водорастворимый краситель Rose Bengal (RB) может выступать в качестве перспективного лекарственного вещества, поскольку он имеет свойства флуоресценции и фотосенсибилизации, тем самым оказывая цитотоксическое действие на раковые клетки при возбуждении внешним источником света. Задачей данного исследования является разработка системы направленной доставки RB в составе PLGA наноматрицы к раковым клеткам, характеризующимся сверхэкспрессией онкомаркера HER2.

Для направленной доставки наноагентов к онкомаркеру HER2 на поверхности раковых клеток, было использовано аффибоди $Z_{HER2:342}$. В ходе выполнения работы были получены наноагенты PLGA/RB методом двойной эмульсии, гидродинамический размер которых составил 198 ± 5 нм. С использованием метода клик-химии были получены таргетные наноагенты PLGA/RB, модифицированные аффибоди $Z_{HER2:342}$. Методом проточной цитометрии проведена количественная оценка связывания конъюгатов PLGA/RB* $Z_{HER2:342}$ с HER2+ клеточными линиями. Показано, что PLGA/RB* $Z_{HER2:342}$ селективно связываются с HER2+ клетками аденокарциномы молочной железы человека, SKBR-3, в то время как с контрольными HER2- клетками CHO связывания не обнаруживается.

Дальнейшие направления исследования заключаются в исследовании фотоиндуцированной клеточной гибели HER2+ клеток *in vitro* и *in vivo*. Данное исследование является шагом на пути к созданию средств тераностики раковых заболеваний, характеризующихся сверхэкспрессией HER2 рецептора.

Исследование поддержано грантом РФФИ 17-74-20146.

М.И. Сулацкий, О.И. Поварова, А.И. Сулацкая ВЛИЯНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ НА ЗРЕЛЫЕ АМИЛОИДНЫЕ ФИБРИЛЛЫ

Институт Цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

M.I. Sulatsky, O.I. Povarova, A.I. Sulatskaya THE INFLUENCE OF THE FLUORESCENT PROBES ON THE MATURE AMYLOID FIBRILS

Institute of Cytology Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Tikhoretsky ave. 4, 194064, Russia,

m_sulatsky@mail.ru

Флуоресцентные зонды тиофлавин Т (ThT) и 1-анилино-8-нафталинсульфонат (ANS) широко используются для диагностики образования и исследования структуры упорядоченных белковых агрегатов, амилоидных фибрилл, накопление которых сопутствует ряду тяжелых заболеваний, так называемых амилоидозов. Однако возможное влияние этих зондов на амилоидные

фибриллы изучено недостаточно. В настоящей работе мы исследовали фотофизические характеристики, структуру и морфологию зрелых амилоидных фибрилл на основе двух модельных амилоидогенных белков, инсулина и лизоцима, в присутствии ThT и ANS.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ANS оказывает влияние на вторичную структуру амилоидных фибрилл (показано для фибрилл на основе инсулина и лизоцима) и на степень их агрегации (показано для фибрилл на основе лизоцима), в то время как ThT такого воздействия не оказывает. Анализ фотофизических характеристик красителей, связанных с амилоидными фибриллами на основе различных белков, позволил сделать заключение о различии механизмов взаимодействия ThT и ANS с фибриллами.

Согласно современным представлениям, ThT встраивается в бороздки, образованные бета-листами фибрилл, вдоль длинной оси волокна фибриллы перпендикулярно бета-листам. Сделано предположение, что обнаруженное воздействие ANS на амилоидные фибриллы обусловлено электростатическими взаимодействиями между отрицательно заряженными молекулами красителя и катионными группами на поверхности амилоидных фибрилл (в отличие от гидрофобного связывания ThT), что индуцирует конформационные изменения амилоид-формирующих белков. Это взаимодействие, вероятно, приводит к ослаблению отталкивания между положительными зарядами на поверхности амилоидных фибрилл и может способствовать кластеризации фибриллярных волокон.

Показано, что при изменении условий получения амилоидных фибрилл, и, следовательно, изменении их структуры, а также при дефрагментации фибрилл после их ультразвуковой обработки характер воздействия ANS на фибриллы не изменяется, а влияние ThT на амилоиды все также отсутствует, что свидетельствует об универсальности обнаруженных эффектов. На основании полученных результатов сделано заключение о том, что к использованию флуоресцентного зонда ANS для изучения амилоидных фибрилл нужно подходить с осторожностью, поскольку этот краситель может оказывать непосредственное влияние на объект исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-74-10100, эксперименты с амилоидными фибриллами на основе лизоцима), Стипендии Президента РФ (СП-841.2018.4, эксперименты с амилоидными фибриллами на основе инсулина) и РФФИ (проект № 16-04-01614, отработка методики получения амилоидных фибрилл).

И.Н. Тертеров¹, И.А. Поздняков²

**КООРДИНАЦИЯ ИОНОВ ВОКРУГ
КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП В СЕЛЕКТИВНЫХ
ФИЛЬТРАХ ЗУКАРИОТИЧЕСКИХ
ПОТЕНЦИАЛ-УПРАВЛЯЕМЫХ НАТРИЕВЫХ
И КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ**

¹ Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический), Санкт-Петербург, Россия

² Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

I.N. Terterov¹, I.A. Pozdnyakov²

**ION COORDINATION AROUND CARBOXYL
GROUPS IN THE SELECTIVITY FILTERS
OF EUKARYOTIC SODIUM AND CALCIUM
VOLTAGE-GATED CHANNELS**

¹ Saint-Petersburg Clinical Scientific and Practical Center of Specialized Types of Medical Care (Oncological), Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

ivan.terterov@gmail.com

Эукариотические потенциал-управляемые натриевые (Nav) и кальциевые (Cav) каналы играют важнейшую роль в таких физиологических процессах клетки как электровозбудимость, подвижность, секреция и др. Эти каналы принадлежат к обширному семейству четырехдоменных каналов (FVCC), члены которого являются гомологами и происходят от предковой формы, имеющейся уже у последнего общего предка эукариот. Эта предковая форма FVCC, по-видимому, функционально являлась потенциал-управляемым каналом с кальциевой проницаемостью и имела селективный фильтр вида E/E/E/E. Такой же состав селективного фильтра канала сохраняет большинство Cav. В то же время, возникновение натриевой селективности среди FVCC связывают с появлением селективных фильтров с аминокислотным составом D/E/K/A. Электрофизиологические исследования Nav с мутациями в селективном фильтре, а также естественное разнообразие эукариотических FVCC указывают на легкость «переключения» селективности канала с натриевой на кальциевую, что свидетельствует о схожести пространственной структуры селективных фильтров Nav и Cav.

С развитием методов крио-электронной микроскопии, в последние несколько лет появилась возможность сравнить структурные особенности селективных фильтров Nav и Cav на атомарном уровне. Так, из недавно опубликованных структур каналов Nav1.4 и Cav1.1 видно, что они имеют общую пространственную организацию, а в области селективного фильтра положения соответствующих атомов главной цепи совпадает с точностью до нескольких ангстрем. Боковые цепи аминокислотных остатков фильтров направлены в просвет поры. Предполагается, что они специфично координируют частично гидратированные ионы, тем самым обеспечивая их селективную проницаемость. Недавно при помощи моделирования методом молекулярной динамики было показано, что важным механизмом для натриевой селективности Nav является способность ионов натрия образовывать координационный кластер с карбоксильными группами подвижных остатков глутамата и/или аспартата в селективном фильтре. Схожие кластеры были показаны и для E/E/E/E фильтра бактериальных натриевых каналов. Однако, неясным остается вопрос, насколько это функциональное свойство характерно для Cav и насколько это свойство эукариотических Nav унаследовано от Cav. В данной работе при помощи молекулярной динамики мы сравнили характерные паттерны координации ионов натрия и подвижных цепей селективных фильтров родственных каналов Cav1.1 и Nav1.4.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ No 18-34-00992.

А.О. Травина¹, Н.В. Ильичева¹, С.В. Шабельников¹,
А.Г. Миттенберг¹, О.И. Подгорная^{1,2,3}

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИНКЕРНОЙ ОБЛАСТИ
UDTRF2 ТЕЛОМЕР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА
TRF2 С ПРЕДСТАВИТЕЛЯМИ СЕМЕЙСТВА
ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ
И СЕМЕЙСТВА ПРОТЕИН-ДИСУЛЬФИД-
ИЗОМЕРАЗ**

¹ Институт Цитологии Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный
Университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Дальневосточный Федеральный Университет,
Владивосток, Россия

A.O. Travina¹, N.V. Ilyicheva¹, S.V. Shabelnikov¹,
A.G. Mittenberg¹, O.I. Podgornaya^{1,2,3}

**INTERACTION OF UDTRF2 LINKER REGION
OF TELOMER-BINDING PROTEIN TRF2 WITH
REPRESENTATIVES OF THE FAMILY
OF INTERMEDIATE FILAMENTS AND THE
FAMILY OF PROTEIN-DISULFIDE-ISOMERASES**

¹ Institute of Cytology Russian Academy of Science,
Saint-Petersburg, Russia,

² Saint Petersburg State University, Saint-Petersburg,
Russia

³ Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

alotra1@yandex.ru

Теломер-специфический комплекс шелтерин образуют 6 белков: TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1 и POT1. Некоторые белки шелтерина, включая TRF2, совместно фракционируются с ядерным матриксом (ЯМ). Известно, что ламин А/С, входящий в состав внешней части ЯМ ядерной ламины (ЯЛ), взаимодействует с TRF2, но не TRF1 [1]. TRF1 и TRF2 имеют сходную доменную структуру, их димеризационные TRFH- и ДНК-связывающие Mub-домены обладают высокой степенью гомологии. Между TRFH-доменом и Mub-доменом TRF2 имеет плохо охарактеризованную неупорядоченную область udTRF2.

Получен рекомбинантный белок, соответствующий udTRF2, и поликлональные антитела к нему. Взаимодействие udTRF2 с ламинами, промежуточными филаментами (ПФ) V-типа, показано ко-иммунопреципитацией рекомбинантного udTRF2 с экстрактом ЯЛ, выделенным из ядер клеток печени мышей, и последующим иммуноблоттингом. Для поиска других белков, способных взаимодействовать с udTRF2, проводили ко-иммунопреципитацию с ядерным экстрактом. В качестве контроля неспецифического связывания антитела, иммобилизованные на сефарозе, инкубировали с ядерным экстрактом. С помощью LC-MALDI анализа среди белков, взаимодействующих с udTRF2, идентифицировали представителей ПФ III-типа, имеющих сходную структуру с ламинами, и протеин-дисульфид-изомеразы PDI3, PDI4, PDI6. PDI3 участвует в прикреплении ДНК к ЯМ [2]. С помощью программы ELM в последовательности PDI3 определили мотив связывания с TRF2. Таким образом, udTRF2 может играть роль во взаимодействии теломер с ЯМ и в организации теломер внутри ядра.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 19-34-80032) и РНФ (проект № 19-74-20102).

Литература:

1. Wood A., Danielsen J., Lucas C. et al. TRF2 and lamin A/C interact to facilitate the functional organization of chromosome ends. *Nature communications* 2014; 5: 5467.

2. Ferraro A., Altieri F., Coppari S. et al. Binding of the protein disulfide isomerase isoform ERp60 to the nuclear matrix-associated regions of DNA. *Journal of cellular biochemistry* 1999; 72(4): 528–39.

Н.А. Трусова¹, А.И. Лихачев², Ю.А. Нащекина³
**СПОСОБЫ ФИЗИЧЕСКОЙ И ХИМИЧЕСКОЙ
ФИКСАЦИИ ГЕЛЯ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА
I ТИПА**

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого (СПбПУ)

² Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе
Российской академии наук

³ Институт цитологии Российской академии наук

N.A. Trusova¹, A.I. Likhachev², Y.A. Nashchekina³

**METHODS OF PHYSICAL AND CHEMICAL
FIXATION OF A GEL BASED ON COLLAGEN I TYPE**

¹ Sankt Petersburg Polytechnic University (Peter the
Great SPbPU)

² Physical and Technical Institute named after A.F. Ioffe
of the Russian Academy of Sciences

³ Institute of Cytology of the Russian Academy
of Sciences

nanananatalya@gmail.com

Коллаген — фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани организма (сухожилие, кость, хрящ, дерма и т. п.) и обеспечивающий её прочность и эластичность. На данный момент разрабатывается множество лекарств и заместителей ткани человека на его основе. Однако при использовании продуктов из чистого коллагена исследователи столкнулись с серьезной проблемой — недостаточная прочность и быстрая деградация коллагена. Цель работы — модификация коллагенового геля физическим и химическим способами для увеличения его стабильности.

Коллаген I типа получали из крысиных хвостов методом кислотной экстракции. На основе полученного коллагена приготавливали гели концентраций 0,5; 1; 2 и 3 мг/мл. Химическую стабилизацию гелей производили до доведения pH за счет добавления различных концентраций фитиновой кислоты (0,01; 0,1; 1%, MW=660,04 г/моль). Физическую стабилизацию осуществляли двумя способами. Первый — воздействие УФ облучения с длиной волны 254,7 нм на готовые гели в течение разного времени (30, 60, 120 мин). Второй — приготовление гелей в сетках с разным размером ячейки (1, 2, 3, 5, 7 мм). Сетки получали с помощью 3D-принтинга из полимера молочной кислоты полилактида. Деградацию коллагена определяли с помощью метода Хартри-Лоури через 1 сутки. В результате работы было показано, что с увеличением времени облучения УФ деградация коллагенового геля сначала увеличивается, а затем уменьшается, и наблюдается обратный эффект — его сшивание. Оптимальный размер ячейки для фиксации коллагена зависит от его концентрации (с концентрацией C = 2 мг/мл оптимальна ячейка не менее 1 мм, для геля с C = 1 мг/мл — меньшего размера: 1–2 мм). Показано, что оптимальное время воздействия фитиновой кислоты на коллаген до доведения pH — 30 минут. Гели, содержащие фитиновую кислоту, намного стабильнее исходных (гель с 1% фитиновой кислотой деградировал за сутки почти в два раза меньше, чем обычный гель без модификаций).

По результатам исследований можно сделать вывод, что воздействие фитиновой кислоты и УФ-облучения

на коллагеновый гель, а также помещение геля в полилактидные сетки способствуют его стабилизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20-03-00400_a).

**Г.Е. Филонова, Д.С. Каплун, Ф.С. Шарко,
А.М. Мазур, Е.Б. Прохорчук, С.В. Женило**

СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ С ВЫКЛЮЧЕННОЙ МЕТИЛ-ДНК СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ KAISO

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

**G.E. Filonova, D.S. Kaplun, F.S. Sharko,
A.M. Mazur, E.B. Prokhortchouk, S.V. Zhenilo**

ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF CELL LINES WITH TURNED OFF METHYL DNA BINDING ACTIVITY OF KAISO

Federal State Institution "Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences», Moscow, Russian Federation

Filonova112233@gmail.com

Среди факторов, вовлеченных в установление, поддержание и интерпретацию метилирования ДНК, находится метил-ДНК связывающий белок Kaiso, который обеспечивает связь между метилированием ДНК и модификациями гистонов, при определенных условиях может участвовать в переводе активного хроматина в неактивный. Kaiso является бимодальным фактором, он связывается как с метилированной ДНК, так и с неметилированной последовательностью KBS (CTGCNA). Кроме того, Kaiso может потенциально конкурировать с одним из факторов Яманаки Klf4 за связывание с метилированной ДНК, поскольку оба белка имеют сродство к одним и тем же метилированным последовательностям. Нокаут Kaiso приводит к более эффективному репрограммированию соматических клеток, приводя к повышенной пролиферативной активности. Остается открытым вопрос, какую роль играет метил-ДНК связывающая активность Kaiso в клетке. Цель данной работы: получение и характеристика модельной системы с формой белка Kaiso, неспособной связываться с метилированной ДНК. Мутация E535A во втором цинковом пальце Kaiso предотвращает связывание белка с метилированными, но не с CTGCNA содержащими последовательностями [1]. Нам удалось это подтвердить с помощью метода задержки подвижности в геле. Мы решили получить две модельные системы: клеточную линию рака почки, в которой будет внесена замена в эндогенную последовательность Kaiso, предотвращающую связывание с метилированными CpG, и мышинные эмбриональные фибробласты нокаутные по гену Kaiso с экзогенным Kaiso с точечной мутацией. Нами были получены лентивирусы, кодирующие Kaiso дикого типа, мутантную форму Kaiso и контрольный вектора без вставки. Эти лентивирусы были использованы для трансдукции МЭФ (Kaiso-/-). Анализ транскриптомы полученных клеток подтвердил экспрессию лентивирусных конструкций. В полученных клетках мы детектировали снижение экспрессии целого ряда импринтированных генов. Для получения второй модели были подобраны последовательности двух гайдовых РНК, находящихся в непосредственной близости от E535 в Kaiso. Была подобрана последовательность для

донорной ДНК, содержащая не только целевую мутацию, но и мутацию в РАМ последовательности и мутацию с внесением сайта рестрикции NheI, две последних мутации не влияли на аминокислотную последовательность белка. Полученные модельные системы позволят в дальнейшем разделить функции белка Kaiso, обусловленные метил-ДНК связывающей активностью или связыванием с неметилированными последовательностями.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-29-04139

Литература:

1. N. Sasai, M. Nakao, P.A. Defossez, Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins, *Nucleic Acids Research*, 2010 Aug;38(15):5015–22.

**Д.А. Халенёва^{1,2}, С.С. Ефимова¹, Е.В. Литасова³,
Л.Б. Пиотровский³, О.С. Остроумова¹**

ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ КОМПЛЕКСОВ ФУЛЛЕРЕНА С ГЕКСОМЕТОНИЕМ НА МОДЕЛЬНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

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

² *Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

**D.A. Khaleneva^{1,2}, S.S. Efimova², E.V. Litasova³,
L.B. Piotrovsky³, O.S. Ostroumova²**

EFFECTS OF WATER-SOLUBLE FULLERENE COMPLEXES WITH HEXAMETHONIUM ON THE MODEL LIPID MEMBRANES

¹ *Institute of Cytology Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia*

² *Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia*

³ *Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia*

daryakhaleneva@mail.ru

Водорастворимые производные фуллеренов обладают широким спектром биологической активности благодаря тому, что могут проникать через мембраны, а также увеличивать их проницаемость для других веществ. Перспективным направлением их применения является создание систем переноса лекарственных препаратов через гемато-энцефалический барьер.

Целью работы было установление механизмов влияния водорастворимых комплексов фуллерена с гексаметином на физико-химические свойства мембраны и способности формировать ион-проводящие поры в липидных бислоях. В работе были использованы гексаметониевая соль аддукта, представляющего собой смесь фуллеренолов, содержащих от 4 до 6 остатков 6-аминогексановой кислоты (ИЭМ-2197), и две соли с гексаметином дизамещенных малонатных аддуктов, отличающихся расположением малонатных остатков на поверхности (экваториальный, ИЭМ-2144, и 3-транс, ИЭМ-2143).

Электрофизиологическим методом установлено, что ИЭМ-2143 и ИЭМ-2144 вызывают формирование трансмембранных пор в диолеилфосфохолиновых бислоях при концентрациях 0.3 и 0.02 мг/мл. Разрыв бислоя происходит при концентрациях более 2 мг/мл для ИЭМ-2197,

1 мг/мл для ИЭМ-2144 и 0.3 мг/мл для ИЭМ-2143. Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии показано, что ИЭМ-2197 не влияет на температуру фазового перехода дипальмитоилфосфохолина (ДПФХ) при эквимоллярной добавке по отношению к липиду. В аналогичной концентрации ИЭМ-2143 и ИЭМ-2144 приводят к снижению температуры плавления ДПФХ на 1.6 °С и 2.1 °С, соответственно, при этом наблюдается выраженная деконволюция основного пика в обоих случаях. Установлено, что ИЭМ-2197 снижает температуру фазового перехода, отрицательно заряженного дипальмитоилфосфосерина на 3.5 °С и вызывает выраженную деконволюцию основного пика при эквимоллярной добавке к липиду. Обсуждаются механизмы взаимодействия тестируемых комплексов с мембранными липидами.

Работа выполнена в рамках грантов РФФИ № 19-14-00110 и РФФИ 18-34-20047 мол_а_вед. С. Ефимова отмечена стипендией СП-484.2018.4.

**Ш.И. Чалабов^{1,2}, Е.П. Шуколюкова¹,
М.А. Чеботарева¹, С.А. Забелинский¹,
Е.Р. Никитина¹, Н.К. Кличханов², А.И. Кривченко¹**
**ФОСФОЛИПИДЫ ЭРИТРОЦИТОВ СУСЛИКОВ
ПРИ ГИБЕРНАЦИИ**

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии,
Санкт-Петербург, Россия

² Дагестанский государственный университет,
Махачкала, Россия

**S.I. Chalabov^{1,2}, E.P. Shukolyukova¹,
M.A. Chebotareva¹, S.A. Zabelinski¹, E.R. Nikitina¹,
N.K. Klichkhanov², A.I. Krivchenko¹**

**PHOSPHOLIPIDS OF THE GROUND SQUIRRELS
ERYTHROCYTES DURING HIBERNATION**

¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and
Biochemistry, Saint-Petersburg, Russia

² Dagestan State University, Makhachkala, Russia

biowulf05@gmail.com

Мембранные липиды, в частности фосфолипиды (ФЛ) участвуют в температурной адаптации гетеротермов. Однако до сих пор не ясно, каким образом изменяется липидный состав мембран их клеток при выходе из гибернации. Исследования липидного состава мембран при пробуждении перспективно для выяснения механизмов адаптации млекопитающих к низким температурам.

Цель работы — исследование фосфолипидного состава мембран эритроцитов (МЭ) сусликов при зимней спячке и искусственном пробуждении.

Работа выполнялась на малых сусликах (*Spermophilus pygmaeus*). Средняя температура тела (ТТ) экспериментальных животных во время спячки составляла 4,5 °С. Выводились суслики из гибернации путем переноса их в помещение с температурой ~ 22 °С. По достижении ТТ 10 °С, 20 °С, 25–30 °С, 37 °С суслики были взяты в эксперимент. Контролем являлись осенние активные животные.

Содержание общих ФЛ при гибернации снижается, на начальных этапах пробуждения не изменяется, а на поздних (при ТТ 25–37 °С) — возвращается к контрольным значениям.

Основными классами ФЛ мембран являются фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), сфингомиелин (СФМ), фосфатидилсерин (ФС) и монофосфоинозитиды (МФИ). В торпидном состоянии и последующем пробуждении сусликов уровень ФХ не изменяется,

содержание СФМ увеличивается, а ФЭА и ФС снижается. При гибернации и на начальных этапах пробуждения количество МФИ в МЭ не изменяется, но в диапазоне ТТ 25–37 °С его уровень снижается. После полного пробуждения животных содержание СФМ, ФЭА и ФС в МЭ полностью нормализуются. В торпидном состоянии и начальных этапах пробуждения в МЭ увеличивается соотношение ФЛ, расположенных преимущественно на внешнем (ФХ+СФМ) и внутреннем (ФЭА+ФС) слое мембраны соответственно. Поскольку эти ФЛ существенно отличаются по содержанию насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, то такие изменения могут отражаться на текучести МЭ. Кроме того, ФС и МФИ участвуют в запуске различных сигнальных путей, участвующих в поддержании мембранных функций. В целом полученные данные указывают на адаптивные изменения фосфолипидного состава МЭ, позволяющие эритроцитам функционировать при меняющейся температуре тела.

Работа выполнена в рамках госзадания № АААА-А18-118012290371-3.

**А.А. Чепанова¹, Н.С. Ли-Жуланов^{2,3},
Т.А. Кургина^{1,3}, А.Л. Захаренко¹, О.Д. Захарова¹,
К.П. Волчо^{2,3}, Н.Ф. Салахутдинов^{2,3}, О.И. Лаврик^{1,3}**
**РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ
TDP1 НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ
ХРОМЕНОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ
ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ**

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

² Новосибирский институт органической химии
им. Н.Н. Ворожцова СО РАН Россия, г. Новосибирск

³ Новосибирский государственный университет
Россия, г. Новосибирск

**A.A. Chepanova¹, N.S. Li-Zhulanov^{2,3},
T.A. Kurgina^{1,3}, A.L. Zakharenko¹, O.D. Zakharova¹,
K.P. Volcho^{2,3}, N.F. Salakhutdinov^{2,3}, O.I. Lavrik^{1,3}**

**DEVELOPMENT OF TDP1 INHIBITORS
BASED ON DERIVATIVES OF CHROMENE
AS POTENTIAL ANTI-CANCER DRUGS**

¹ Novosibirsk Institute of Chemical Biology and
Fundamental Medicine, SBRAS, Russian Federation,
Novosibirsk

² N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic
Chemistry, SBRAS, Russian Federation, Novosibirsk

³ Novosibirsk State University, Russian Federation,
Novosibirsk

arinachepanova@mail.ru

Одним из перспективных направлений в лечении рака является поиск агентов, увеличивающих эффективность химио- и радиотерапии, направленной на повреждение ДНК опухолевых клеток. Результат терапии зависит от эффективности работы систем репарации ДНК, ингибирование которых рассматривается как перспективный подход за счёт накопления повреждений ДНК и повышения чувствительности раковых клеток.

Многообещающими мишенями для такой сопровождающей терапии являются ферменты тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) [1], удаляющая повреждения с 3'-конца ДНК, и поли(АДФ-рибозо)полимераза 1 (ПАРП1), регулятор сразу нескольких механизмов репарации ДНК [2]. Ингибиторы Tdp1 и ПАРП1 могут

усиливать эффект химиопрепаратов, таких как топотекан, темозоломид, цисплатин, доксорубин.

Соединения, содержащие хромоновый остов, представляют интерес для медицинской химии благодаря широкому спектру биологической активности и вариативности в модифицировании соединений.

Опираясь на результаты предварительных исследований [3], были синтезированы амидные производные октагидрохромонов. Было обнаружено, что эти соединения проявляют ингибирующую активность в отношении Tdp1 в микромолярном диапазоне. Данный тип ингибиторов Tdp1 перспективен для дальнейшего изучения.

Для PARP1 ингибирующей активности не выявлено.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-44-543001

Литература:

1. Interthal H et al., The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(21):12009–14.
2. Kamaletdinova T et al., The Enigmatic Function of PARP1: From PARylation Activity to PAR Readers. Cells. 2019; 8(12),1625;
3. Li-Zhulanov et al., A Novel Class of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors That Contains the Octahydro-2H-chromen-4-ol Scaffold. Molecules, 2018, 23(10), 2468;

Е.В. Чепелева¹, И.Г. Мухина¹,
Е.С. Викулова², А.А. Жеравин¹

ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ОНКОХИРУРГИИ НА ОСНОВЕ НИКЕЛИДА ТИТАТА С МОДИФИЦИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ

¹ ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия

² Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, Новосибирск, Россия

E.V. Chepeleva¹, I.G. Mukhina¹,
E.S. Vikulova², A.A. Zheravin¹

IN VITRO STUDY OF THE CYTOTOXICITY OF NEW IMPLANTS FOR RECONSTRUCTIVE ONCOLOGICAL SURGERY BASED ON MODIFIED SURFACE TITANIUM NICKELIDE

¹ “E. Meshalkin National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

² Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry of SB RAS, Novosibirsk, Russia

mukhina_i@meshalkin.ru

Хирургическое вмешательство является основным методом лечения злокачественных новообразований грудной стенки. Среди серьезных осложнений реконструктивных операций на грудной стенке чаще всего встречаются дыхательная недостаточность и инфекционно-воспалительные осложнения, при этом частота и структура их напрямую связана с методом реконструкции реберного каркаса и покровных тканей. Для восстановления каркасности в настоящее время широко применяются искусственные материалы нецелевого назначения, не обеспечивающие достаточную биоинертность и биосовместимость с тканями организма. Никелид титана (нитинол) является сертифицированным материалом для использования

в медицинских целях в качестве имплантируемых изделий на территории РФ. Материал показал высокую биологическую совместимость с тканями организма и является очень перспективным в реконструктивной хирургии.

В данной работе для придания материалу дополнительных биохимических свойств, его поверхность модифицировали ультратонкими пленками иридия, а также сочетанием их с наночастицами золота, методом химического осаждения из газовой фазы (MOCVD). В эксперименте *in vitro* с использованием культуры лимфоцитов человека исследовалась прямая цитотоксичность образцов нитиноловых имплантатов с модифицированной поверхностью, в качестве контроля использовались немодифицированные образцы. Для количественной оценки жизнеспособности клеток при культивировании их на поверхности имплантатов использовали ХТТ-тест, а также измеряли активность лактатдегидрогеназы в питательной среде через 24 и 48 часов после начала эксперимента. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что модификация поверхности нитиноловых имплантатов ультратонкими пленками иридия, а также сочетанием их с наночастицами золота не оказывает цитотоксического эффекта *in vitro*. Таким образом, данные материалы могут быть использованы в дальнейшем при экспериментальных операциях по замещению костных дефектов у лабораторных животных.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 19-415-540012 p_a.

Ю.О. Чернов^{1,2*}, А.А. Рубель^{2,3,4}, Л.М. Джей-Гарсия¹, З. Декнер¹, А.В. Гризель²,
А.А. Зелинский^{2,3}, А.Е. Зобнина^{2,4}, Д.В. Качкин^{2,3,4},
К.Ю. Куличихин², О.А. Маликова^{2,3,4}, Т.А. Чернова⁵

РОЛЬ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ В НАСЛЕДСТВЕННОСТИ, КЛЕТЧНОЙ ПАМЯТИ И ЗАБОЛЕВАНИЯХ

¹ School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

² Научная лаборатория биологии амилоидов

³ Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Научно-технологический университет Сириус, Сочи, Россия

⁵ Department of Biochemistry, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA

Y.O. Chernoff^{1,2*}, A.A. Rubel^{2,3,4}, L.M. Jay-Garcia¹,
Z. Deckner¹, A.V. Grizel², A.A. Zelinsky^{2,3,4},
A.E. Zobnina^{2,4}, D.V. Kachkin^{2,3,4}, K.Y. Kulichikhin²,
O.A. Malikova^{2,3,4}, T.A. Chernova⁵

ROLE OF PROTEIN AGGREGATION IN THE INHERITANCE, CELLULAR MEMORY AND DISEASE

¹ School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

² Laboratory of Amyloid Biology and

³ Department of Genetics and Biotechnology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

⁴ Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

⁵ Department of Biochemistry, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA

yury.chernoff@biology.gatech.edu

Различные белки могут образовать как жидкие или гелеобразные конденсаты, так и упорядоченные фибриллярные агрегаты (амилоиды) в клетках и организмах. Предполагается что способность к агрегации представляет собой древнее свойство белков, которое могло способствовать их предохранению от разрушения и процессам компартиментализации в пребиотических условиях. Инфекционные белковые изоформы (прионы), как правило имеющие амилоидную природу, вызывают заболевания человека и животных, и передают наследуемые признаки у дрожжей и других грибов. Метастабильные прионоподобные агрегаты выступают в качестве носителей клеточной памяти, в частности после стресса. Предсуществующий прион определяет формирование и расположение бета-структур во вновь присоединяемой молекуле, тем самым выступая в роли структурной матрицы. Таким образом, прионы воспроизводят и передают изменения белковой структуры, не записанные в последовательности ДНК. Механизм образования наследуемых прионов сходен с механизмами, вовлечёнными в прионные и амилоидные заболевания человека (включая болезнь Альцгеймера). Благодаря этому, дрожжи могут использоваться в качестве удобной модели для изучения молекулярных основ амилоидных заболеваний. Экспрессия белков человека в дрожжах и использование химерных конструкций, составленных из белков человека и дрожжей позволяют выявлять новые амилоидогенные белки человека и изучать механизмы их агрегации. Возникновение прионов дрожжей стимулируется временной сверхпродукцией амилоидогенных белков, и регулируется белками-шаперонами (отвечающими за пространственную укладку вновь синтезированных полипептидов) и цитоскелетными структурами. Воспроизведение прионов зависит от фрагментации прионных полимеров по действию шаперонов, которые вовлечены в защиту клеток от стрессовых воздействий. Возникающие олигомеры иммобилизуют новые молекулы белка и конвертируют их в прионную форму. Таким образом, клеточный аппарат защиты от стресса используется для «репликации» прионов. Физиологические условия и факторы среды влияют на прионы через изменения уровней и динамики шаперонов и других взаимодействующих белков.

В докладе приводятся данные, полученные при поддержке грантов 19-34-51054 и 19-34-90153 (РФФИ), 18-74-00041 (РНФ), MCB-1817976 (NSF) и P50AG025688 (NIH), и проекта СПбГУ ID 51140332, а также при технической помощи Ресурсных центров «Биобанк», «Хромас» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

**Д.Н. Чернышова^{1,2}, С.С. Ефимова¹,
З.М. Саркисян³, П. Бремонд⁴, О.С. Остроумова¹**
**ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОГЕКСИЛ-ПРОИЗВОДНЫХ
О-ИМИНО-ИЗОМОЧЕВИНЫ НА ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОДЕЛЬНЫХ
ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН**

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Политехнический
Университет Петра Великого, Санкт-Петербург,
Россия

³ Санкт-Петербургский Государственный
Педиатрический Медицинский Университет, Санкт-
Петербург, Россия

⁴ Aix-Marseille University, Марсель, Франция

**D.A. Chernyshova^{1,2}, S.S. Efimova¹, Z.M. Sarkisyan³,
P. Bremond⁴, O.S. Ostroumova¹**

**EFFECTS OF CYCLOGEXYL-DERIVATIVES
OF O-IMINO-ISOUREA ON THE PHYSICAL AND
CHEMICAL PROPERTIES OF MODEL LIPID
MEMBRANES**

¹ Institute of Cytology Russian Academy of Science,
Saint Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic
University, Saint Petersburg, Russia

³ St.Petersburg State Pediatric Medical University,
Saint Petersburg, Russia

⁴ Aix-Marseille University, Marseille, France

dayanacher77@gmail.com

С точки зрения медицинского применения в настоящее время привлекают к себе внимание циклогексил-производные о-имино-изомочевины, обладающие антиканцерогенной активностью. Первичной мишенью действия любых ксенобиотиков являются мембраны клеток, поэтому целью работы было установление влияния циклогексил-производных о-имино-изомочевины на физико-химические свойства мембраны, такие как дипольный потенциал и плотность упаковки липидов в мембране.

В работе были использованы циклогексил-производные о-имино-изомочевины, ZS-04, ZS-17 и ZS-26, включающие циклогексильный, пиридинильный и изопропиловый радикалы, соответственно.

С помощью диполь-чувствительной пробы di-8-ANNEPS было установлено, что данные агенты не влияют на дипольный потенциал мембран, сформированных из диолеилфосфохолина (ДОФХ), и, следовательно, не влияют на электрические свойства липидного бислоя.

Флуориметрическим методом проведено измерение утечки кальцеина из ДОФХ липосом. Выявлено, что ZS-04 и ZS-17 не влияют на проницаемость мембран для флуоресцентного маркера (утечка кальцеина в пределах 5%), в отличие от ZS-26, который индуцирует утечку красителя из ДОФХ-везикул до 25%.

С помощью дифференциальной сканирующей микрокалориметрии показано, что ZS-17 не влияет на основные характеристики плавления дипальмитилфосфохолина (ДПФХ) вплоть до эквимолярного соотношения к липиду. При соотношении липид к агенту 1:1 ZS-04 и ZS-26 увеличивают температуру основного фазового перехода ДПФХ на 0.8 °C и 0.7 °C, соответственно. При этом, ZS-26 увеличивает ширину основного пика на 1.2 °C и элиминирует предпереход ДПФХ, а ZS-04 не оказывает влияния на ширину пика, но уменьшает температуру предперехода на 2 °C. Молекулярные механизмы взаимодействия тестируемых агентов с мембранными липидами обсуждаются.

Работа выполнена в рамках грантов РНФ № 19-14-00110 и РФФИ 18-34-20047 мол_а_вед.

**Е.В. Шекунов¹, С.С. Ефимова¹, А.А. Чистов^{2,3},
В.А. Коршун^{2,3}, А.В. Устинов^{2,3}, О.С. Остроумова¹**

**МЕМБРАННАЯ АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ
ВИРУСНОГО СЛИЯНИЯ ПЕРИЛЕНОВОГО РЯДА**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Национально-исследовательский университет
«Высшая школа экономики», Москва, Россия

E.V. Shekunov¹, S.S. Efimova¹, A.A. Chistov^{2,3},
V.A. Korshun^{2,3}, A.V. Ustinov^{2,3}, O.S. Ostroumova¹

**MEMBRANE ACTIVITY OF VIRAL FUSION
INHIBITORS OF PERYLENE SERIES**

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic
chemistry, Moscow, Russia

³ National Research University Higher School
of Economics, Moscow, Russia

egor_shekunov@mail.ru

Вирусы являются одним из наиболее патогенных видов облигатных паразитов и характеризуются способностью поражать все типы живых организмов, вызывая широкий спектр патологических состояний. Одним из самых опасных представителей вирусов является вирус гриппа. Так как вирус гриппа относится к оболочечным вирусам, т.е. к вирусам, имеющим липидную оболочку, особо перспективным методом лечения является применение химических агентов, способных изменять физико-химические параметры липидной оболочки вируса. Подобные вещества могут реализовывать свой терапевтический потенциал различными путями, в том числе, изменяя не только проницаемость липидной мембраны для ионов, но и эластические свойства липидного бислоя таким образом, что слияние вирусной частицы и клетки становится энергетически невыгодным [1].

В работе исследованы ингибиторы слияния вирусных частиц на основе перилена [2] которые показали высокую эффективность применения в условиях *in vitro*. В частности, протестированы ингибиторы фенольного ряда, НОЗРУ11 и НОВрРУ13. Для детального понимания механизмов действия соединений изучена их способность формировать поры в липидных бислоях, оценено влияние на дипольный потенциал мембран и возможность модифицировать термотропное поведение мембранообразующих липидов. Выбор модели вироподобной липидной мембраны был обусловлен литературными данными о мажорных компонентах липидной оболочки вируса гриппа [3,4]. Для формирования мембран использовали фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и холестерин в эквимольном соотношении (ФЭ/ФС/Хол).

Установлено, что оба тестируемых соединения в концентрации менее 10 мкМ не увеличивают ионную проницаемость ФЭ/ФС/Хол-бислоев. На фоне активности периленовых ингибиторов отмечено падение стационарного трансмембранного тока, индуцированного комплексами катионов калия с переносчиком нонактином, что указывает на рост дипольного потенциала мембраны в присутствии тестируемых агентов на 60 и 50 мВ для НОЗРУ11 и НОВрРУ13 соответственно. С использованием метода дифференциальной сканирующей калориметрии показано, что изучаемые соединения при соотношении липид к агенту 20 к 1 мало влияют на температуру, кооперативность и энтальпию плавления дипальмитоилфосфохолина. Падение энтальпии на 9% может указывать на формирование небислоиных перилен-обогащенных липидных фаз. Образование подобных структур возможно при модификации спонтанной кривизны липидных монослоев при адсорбции тестируемых ингибиторов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 19-14-00110 и РФФИ 18-34-20047 мол_а_вед.

Литература:

- Vigant F., Lee J., Hollmann A. et al. A mechanistic paradigm for broad-spectrum antivirals that target virus-cell fusion. *PLoS pathogens*. 2013; 9(4).
- Chistov A. A., Orlov A. A., Streshnev P. P. et al. Compounds based on 5-(perylene-3-ylethynyl) uracil scaffold: High activity against tick-borne encephalitis virus and non-specific activity against enterovirus A. *European journal of medicinal chemistry*. 2019; 171: 93–103.
- Gerl M. J., Sampaio J. L., Urban S. et al. Quantitative analysis of the lipidomes of the influenza virus envelope and MDCK cell apical membrane. *Journal of Cell Biology*. 2012; 196(2): 213–221.
- Ivanova P. T., Myers D. S., Milne S. B. et al. Lipid Composition of the Viral Envelope of Three Strains of Influenza Virus — Not All Viruses Are Created Equal. *ACS infectious diseases*. 2015; 1(9): 435–442.

И.Г. Шерстнев^{1,2}, О.И. Поварова¹, Д.С. Поляков³,
Р.Г. Сахабеев³, М.И. Сулацкий¹, А.И. Сулацкая¹

**ВЛИЯНИЕ pH РАСТВОРА НА СТРУКТУРУ
АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ БЕТА-
2-МИКРОГЛОБУЛИНА**

¹ Институт Цитологии Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Политехнический Университет
Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт Экспериментальной медицины,
Санкт-Петербург, Россия

I.G. Sherstnev^{1,2}, O.I. Povarova¹, D.S. Polyakov³,
R.G. Sakhabayev³, M.I. Sulatsky¹, A.I. Sultskaya¹

**pH EFFECT ON THE BETA-2-MICROGLOBULIN
AMYLOID FIBRILS STRUCTURE**

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy
of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic
University, Saint-Petersburg, Russia

³ Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg,
Russia

ansul@mail.ru

Амилоидные фибриллы (АФ) это нерастворимые белковые волокна, накопление которых сопутствует тяжелым заболеваниям [1]. Одним из таких заболеваний является гемодиализный амилоидоз, который возникает в результате накопления бета-2-микроглобулина ($\beta 2m$) у пациентов с почечной недостаточностью при продолжительной гемодиализной терапии. В связи с патогенностью АФ на основе $\beta 2m$, исследование их структуры и свойств, а также влияния на них различных внешних факторов является в настоящее время актуальной задачей [2]. Целью настоящей работы было изучение влияния pH раствора на структуру АФ на основе $\beta 2m$.

В ходе выполнения работы были исследованы структура и физико-химические свойства АФ на основе $\beta 2m$ в растворах с различными значениями pH с использованием методов оптической спектроскопии и электронной микроскопии. Зависимость анизотропии флуоресценции и релеевского светорассеяния АФ, а также интенсивности флуоресценции связанного с АФ амилоид-специфического зонда тиофлавина Т (ThT) от pH раствора имеют колоколообразный характер с максимумом при значении pH, равном 7. Вторичная структура АФ также зависит от кислотно-основных свойств среды. Наиболее

выраженные спектры КД в дальней УФ-области наблюдаются для растворов фибрилл с экстремально низкими значениями pH (1 и 3), при увеличении pH раствора спектры становятся менее выраженными и при достижении pH 12 наблюдается спектр КД, характерный для развернутого белка. Морфологию АФ на основе $\beta 2m$ оценивали с использованием электронной микроскопии. Оказалось, что при экстремальных значениях pH (1, 3, 11) наблюдаются длинные и тонкие фибриллы, в то время как при pH 12 фибрилл не наблюдается. При значениях pH 5, 7 и 9 фибриллы агрегируют друг с другом, образуя крупные кластеры.

Наибольшее количество упорядоченных элементов вторичной структуры в дальней УФ области наблюдается при экстремально низких значениях pH, с увеличением pH их количество уменьшается.

Результаты работы свидетельствуют о том, что pH раствора существенно влияет на длину, степень кластеризации и вторичную структуру АФ на основе $\beta 2m$, а также на количество сайтов связывания с ThT. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 18-74-10100).

Литература:

1. Rambaran RN and Serpell LC. 2008. Prion. 2(3): 112–117.
2. Sulatskaya AI, et al. 2018 Int J Mol Sci. 19(9). pii: E2762.

В.О. Шипунова^{1,2,3}, С.М. Деев^{1,3}

НА ПУТИ К СОЗДАНИЮ ВОЛШЕБНОЙ ПУЛИ — МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАНОАГЕНТЫ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ

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

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

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

V.O. Shipunova^{1,2,3}, S.M. Deyev^{1,3}

ON THE WAY OF CREATION OF MAGIC BULLET — MULTIFUNCTIONAL NANOAGENTS FOR THERANOSTICS

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia

³ National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

viktoriya.shipunova@phystech.edu

Бурно развивающаяся область современной биомедицины, тераностика, подразумевает разработку и внедрение мультимодальных структур, способных осуществлять как диагностические, так и терапевтические функции. Наиболее перспективной платформой для создания таких структур являются наноагенты различной природы. Наноразмерным материалам присущи уникальные свойства, не проявляющиеся у массивных образцов или отдельных атомов, которые позволяют максимально эффективно применять их в биомедицине, например: возможность включения в состав низкорастворимых соединений, нагрев под воздействием

внешних электромагнитных полей, а также адресная доставка химио- или радиопрепаратов только к определенному типу клеток, например, к раковым. Таким образом наноагенты позволяют реализовывать концепцию «магической пули» — идеального агента для терапии и диагностики заболеваний, который воздействует только на очаг заболевания, и при этом не оказывает побочных эффектов.

В докладе представлены результаты серии работ, посвящённых дизайну, синтезу и модификации спектра органических и неорганических наноструктур (магнитных, золотых, серебряных, белковых, кремниевых, гибридных умных структур — биороботов, а также полимерных [1–4]). Разработанные наноструктуры успешно были модифицированы нацеливающими молекулами самой различной природы: как полноразмерными, так и мини-антителами, а также скаффолдовыми распознающими белками неиммуноглобулиновой природы — дарпинами и аффибоди. Был разработан ряд методов по эффективному введению данных супрамолекулярных агентов в организм, в том числе, влияющие на время полувыведения из кровотока и улучшающие накопление в ксенографтных опухолях экспериментальных животных. Данные исследования являются шагом на пути к созданию средств биомедицины нового поколения, которые способны диагностировать очаг болезни и действовать как терапевтическое соединение в случае необходимости.

Исследование выполнено в рамках гранта РФФИ 20-34-70136 (работа с культурами клеток) и РНФ 17-74-20146 (синтез наноконструкций).

Литература:

1. Nikitin M. et al. Biocomputing based on particle disassembly. Nat. Nanotechnol. 2014; 9 (9): 716.
2. Shipunova V. et al. Versatile Platform for Nanoparticle Surface Bioengineering Based on SiO₂-Binding Peptide and Proteinaceous Barnase*Barstar Interface. ACS Appl. Mater. Inter. 2018; 10 (20): 17437–17447.
3. Shipunova V. et al. MPQ-cytometry: a magnetism-based method for quantification of nanoparticle-cell interactions. Nanoscale. 2016; 8 (25): 12764–12772.

М.Ю. Шубина¹, Е.А. Арифупин¹, Д.В. Сорокин²,
М.А. Сосина³, М.А. Тихомирова^{3,4},
М.В. Серебрякова¹, Т. Смирнова⁵, С.С. Соколов¹,
Я.Р. Мусинова^{1,3,6}, Е.В. Шеваль^{1,5}

GAR-ДОМЕН ОБЕСПЕЧИВАЕТ ПРАВИЛЬНОЕ ПОЗИЦИОНИРОВАНИЕ ФИБРИЛЛАРИНА В ПРОСТРАНСТВЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Лаборатория математических методов обработки изображений, факультет вычислительной математики и кибернетики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

⁴ Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия,

⁶ Государственный научный центр лазерной медицины имени Скобелкина ФМБА, Москва, Россия

M.Y. Shubina¹, E.A. Arifulin¹, D.V. Sorokin²,
M.A. Sosina³, M.A. Tikhomirova^{3,4},
M.V. Serebryakova¹, T. Smirnova⁵, S.S. Sokolov¹,
Y.R. Musinova^{1,3,6}, E.V. Sheval^{1,5}

THE GAR DOMAIN INTEGRATES FUNCTIONS THAT ARE NECESSARY FOR THE PROPER LOCALIZATION OF FIBRILLARIN INSIDE EUKARYOTIC CELLS

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Laboratory of Mathematical Methods of Image Processing, Faculty of Computational Mathematics and Cybernetics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁶ Skobelkin State Scientific Center of Laser Medicine FMBA, Moscow, Russia

musinova.yana@gmail.com

Ядрышковая метилтрансфераза фибрилларин играет важную роль в созревании пре-rРНК. Метилтрансферазный домен фибрилларина является чрезвычайно консервативным, его аминокислотная последовательность не была существенно изменена в ходе эволюции от архей до эукариот. Однако при переходе от архей к эукариотам фибрилларин-подобные белки приобрели дополнительный N-концевой домен, обогащенный глицинами и аргининами (Glycine-Arginine-Rich- или

GAR-домен). Проведенные нами исследования показали, что GAR-домен играет роль сигнала ядерной и ядрышковой локализации (NLS и NoLS, соответственно). Причем, для реализации активности NLS необходимо, чтобы аргинины в составе GAR-домена были метилированы. Функция NoLS выражается в накоплении фибрилларина в гранулярном компоненте ядрышка. Можно предположить, такое накопление увеличивает вероятность попадания высокодинамичных молекул фибрилларина в транскрипционные сайты (плотный фибриллярный компонент). Интересно, что накопление в гранулярном компоненте ослаблялось при метилировании аргининов GAR-домена. Таким образом, можно думать, что GAR-домен придал белку дополнительные функции, которые были необходимы белку для эффективного функционирования в составе эукариотической клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ (проект МК-716.2018.4).

Л.С. Шуйский, В.Ю. Васильева ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГИПЕРГЛИКЕМИИ НА ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ В ПОДОЦИТАХ

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

L.S. Shuyskiy, V.Yu. Vasilieva

THE STUDY OF THE HYPERGLYCEMIA MODELING EFFECTS ON STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY IN PODOCYTES

Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia

Leonid.shuyskiy@gmail.com

Диабетическая нефропатия — это комплексное осложнение почек при некомпенсированном течении сахарного диабета. Заболевание сопровождается фиброзом почечных клубочков (гломерул) и повреждениями подоцитов. «Ножки» последних оплетают капилляры, участвуя в фильтрации крови. При сахарном диабете происходят структурные и функциональные нарушения этих клеток (сглаживание «ножек», гипертрофия, апоптоз), что приводит к протеинурии.

В подоцитах свежесыведенных гломерул нами было показано, что при развитии сахарного диабета в модели солечувствительной линии крыс DahlSS наблюдается увеличение активности и экспрессии кальций-проводящих ионных каналов семейства TRPC6. Также мы показали, что в подоцитах свежесыведенных гломерул почек крыс линии Вистар тапсигаргин-индуцированный вход кальция функционально связан с ионными каналами семейства TRPC6. Однако на сегодняшний день остается открытым вопрос о нарушениях депо-управляемого входа кальция в подоцитах при развитии сахарного диабета.

Целью данного исследования является изучение действия глюкозы на депо-управляемый вход кальция в подоцитах. Для моделирования гипергликемии клетки инкубировали с добавлением 25 мМ глюкозы в течение 48 ч. В качестве основного модельного объекта исследования использовали клеточную линию иммортализованных подоцитов человека.

В докладе будут представлены результаты, полученные с использованием метода patch-clamp в конфигурации cell-attached, где мы исследовали действие глюкозы

на тапсигаргин-индуцированный вход кальция через одиночные ионные каналы. Дополнительно, будут представлены результаты экспериментов с использованием кальциевого зонда Fura-2AM, необходимые для оценивания кальциевого сигнала всей клетки. По нашим предварительным данным можно предположить, что при моделировании гипергликемии увеличена активность одиночных ионных каналов, которые по своим биофизическим характеристикам могут быть отнесены к семейству TRPC6. Полученные результаты дают основание утверждать, что при моделировании гипергликемии наблюдаемый нами эффект связан, вероятно, с изменением уровня экспрессии ионных каналов TRPC6. В дальнейшем мы планируем изучить влияние высокой концентрации глюкозы на структуру актинового цитоскелета и на экспрессию белков-участников депо-управляемого входа: STIM1, Orai1.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-00590 мол_а.

С.А. Шумейко, А.Г. Бобылёв, Э.И. Якупова, И.М. Вихлянцев, Л.Г. Бобылёва

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ АМИЛОИДОПОДОБНЫХ АГРЕГАТОВ МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

S.A. Shumeyko, A.G. Bobylev, E.I. Yakupova, I.M. Vikhlyantsev, L.G. Bobyleva

STUDY OF THE STRUCTURE OF AMYLOID-LIKE AGGREGATES OF MYOSIN-BINDING PROTEIN C

Federal state budget institution of science Institute of theoretical and experimental biophysics Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

Shumik92@gmail.com

Агрегация белка — довольно распространенный процесс, который происходит в клетках живых организмов. Агрегировать белок может по амилоидному или неамилоидному типу. Амилоидные агрегаты имеют общие свойства, такие как наличие четвертичной кросс-β структуры, устойчивость к протеолизу, способность

связываться с красителями Конго красным и тирофлавином Т. Образование амилоидных агрегатов ассоциировано со многими заболеваниями человека, такими как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, диабета II типа и др. При данных заболеваниях агрегированные белки способны накапливаться в различных органах и тканях. В настоящее время известно около 36 белков, связанных с амилоидозами. Однако, известны также белки, которые формируют амилоидные или амилоидо-подобные агрегаты для выполнения определенных функций, в литературе названные функциональными амилоидами. Примерами таких функциональных амилоидов могут быть белки бактерий и грибов (курлин, тафи, чаплины и др.). К функциональным амилоидам относятся фибриллы спидроина, которые входят в состав паутиновых нитей, а также фибриллы Pmel17 у млекопитающих.

В данной работе была изучена агрегация *in vitro* сортового цитоскелетного мультидоменного миозин-связывающегося белка-С (С-белка) выделенного из поперечно-полосатых мышц кролика. Показано, что данный белок агрегирует при низкой ионной силе. Важной отличительной особенностью агрегации С-белка является способность формировать крупные аморфные агрегаты (более 2 мкм) в течение 2–3 минут. Было показано формирование олигомеров, на начальных этапах (5–10 мин) и через 16 часов агрегации. Методами малоуглового рентгеновского рассеяния и динамического светорассеяния было продемонстрировано, что олигомеры данного белка содержат от 7 до 12 мономеров в олигомере. Структурные исследования агрегатов С-белка проведенные методом рентгеновской дифракции выявили наличие рефлексов относящихся к кросс-β структуре. Поэтому мы заключили, что агрегаты С-белка являются амилоидными. Важно отметить, что при агрегации С-белка, изменений во вторичной структуре методом кругового дихроизма обнаружено не было.

В этой работе мы показали что особенностью агрегации С-белка является формирование четвертичной кросс-β структуры, которое не сопровождается изменениями во вторичной структуре.

Результаты наших исследований вносят вклад в изучение процесса амилоидной агрегации на структурном уровне.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института теоретической и экспериментальной биофизик (ИТЭБ) РАН при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 18-015-00268).

13 ОКТЯБРЯ 2020

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ПАТОЛОГИИ

А.И. Алексеева^{1,2}, А.С. Халанский¹, С.Ф. Дрозд³,
Н.С. Осипова^{4,5}, С.Э. Гельперина^{4,5}, Г.В. Павлова^{2,3}

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ: 101/8 И С6

¹ НИИ морфологии человека, Москва, Россия

² Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

³ ООО «Апто-фарм», Москва, Россия

⁴ ООО «Технология лекарств», Химки, Московская область, Россия

⁵ РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

A.I. Alekseeva^{1,2}, A.S. Khalansky¹, S.F. Drozd³,
N.S. Osipova^{4,5}, S.E. Gelperina^{4,5}, G.V. Pavlova^{2,3}

COMPARATIVE GENETIC CHARACTERIZATION OF EXPERIMENTAL GLIOBLASTOMA MODELS: 101/8 AND C6

¹ Russian Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² Institute of Gene Biology, Moscow, Russia

³ Apto-Pharm Ltd., Moscow, Russia

⁴ Drugs Technology LLC, Khimki, Moscow Region, Russia

⁵ D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

mariott@bk.ru

Мультиформная глиобластома (ГБ) — злокачественное новообразование ЦНС астроцитарного происхождения. Одним из направлений экспериментальной нейроонкологии является поиск и разработка моделей ГБ на животных, так как существующие модели не удовлетворяют критериям адекватности (инвазия в окружающие ткани, неиммуногенность, соответствие гистологических и молекулярно-генетических характеристик ГБ человека). В исследовании проводится сравнение двух моделей ГБ крыс по молекулярно-генетическим маркерам: С6 (эталонная модель ГБ) и 101/8 (тканевой перевиваемый штамм).

Животным (самцы крыс Wistar) имплантировали культуру клеток (для С6) или ткани (для 101/8) в количестве 1 млн. кл-к. Для анализа экспрессии генов методом RT-PCR использовали образцы ткани из опухоли на 14–18 дни после имплантации. Для оценки гетерогенности из каждой опухоли брали образец центральной и периферической части. Тестирование проводили по следующим маркерам: ABCB1b, Sox2, Wnt3, MELK, L1CAM. В качестве контроля использовали образцы ткани из области места подсадки у интактных животных. Достоверность разницы определяли по критерию Манна-Уитни.

Результаты. Выявлены достоверные различия от контроля по ряду онкогенов для обоих штаммов.

Наибольшее изменение экспрессии (увеличение) отмечено для гена MELK, отвечающего за пролиферацию (увеличение в 24 раза для центральной и периферической зоны С6 и в 7 и 32 раза для центральной и периферической части 101/8. Для гена Sox2 (маркер стволовости) отмечено повышение в 4,4 и 1,2 раза для С6; в 2,2 и 4,7 раза для центральной и периферической зоны 101/8. Для маркера Wnt3 отмечено увеличение

в 2,1 и 1,9 раз для центральной и периферической части С6 и в 3,3 раза для периферической части 101/8. Для маркера множественной лекарственной устойчивости ABCB1b отмечено увеличение в 11,3 и 3,9 для С6; 1 и 4,4 для 101/8. Данные изменения характерны для типичного течения ГБ человека. В то же время отмечено существенное снижение маркера L1CAM, отвечающего за межклеточную адгезию (в 8 и 3,6 раз для С6; 41 и 4 для 101/8), что нехарактерно для спонтанной ГБ. Анализ полученных данных по центральной и краевой части показывает, что экспериментальная ГБ 101/8, для которой характерно увеличение экспрессии маркеров на периферии по сравнению с центром, в большей степени удовлетворяет критериям адекватности модели, чем С6, так как для ГБ человека характерен рост периферией и, как следствие, изменения там выражены больше, чем в центральной части. Для С6 для изученных маркеров характерна или одинаковая экспрессия в центре и на периферии или снижение экспрессии на периферии, что указывает на то, что данный штамм растет центральной зоной.

Полученные данные представляют интерес для изучения процессов канцерогенеза и разработки экспериментальных моделей ГБ у лабораторных животных.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-01012.

В.В. Алифанов, А.В. Бузенкова,
О.Е. Савельева, Л.А. Таширева

ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА ГЕТЕРОГЕННЫ ПО ПРИЗНАКАМ СТВОЛОВОСТИ И ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА

НИИ онкологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Россия

V.V. Alifanov, A.V. Buzenkova,
O.E. Savelieva, L.A. Tashireva

HETEROGENEITY OF TUMOR CELLS BY STEM AND EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION FEATURES IN BREAST CANCER PATIENTS

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

alifanov.vl@yandex.ru

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) одно из важнейших событий, обеспечивающих инвазию эпителиальных опухолевых клеток. Имеются данные, что наиболее эффективным для образования метастазов является гибридное эпителиально-мезенхимальное состояние, а индикатором продолжающегося ЭМП может являться N-cadherin. ЭМП связывают с возникновением стволово-подобных свойств опухоли [1]. При этом

показано, что сочетание стволовости с ЭМП обеспечивают миграционную и инвазивную способность клеток. Таким образом, изучение проявлений ЭМП и стволовости опухолевых клеток первичной опухоли позволит приблизиться к пониманию процесса метастазирования. Методом мультиплексной иммунофлуоресценции с использованием антител против CK7 (RTU, Dako, USA), CD44 (1:100, Thermo, USA), CD24 (1:100, Thermo, USA), N-cadherin (1:500, Abcam, UK) нами было проанализировано 33 образца ткани опухоли молочной железы, полученных от больных инвазивной карциномой молочной железы не специфического типа (ИКНТ), возраст которых составил $50,2 \pm 11,5$ лет. Количество клеток выразилось в процентах от общего числа опухолевых клеток. Статистическая обработка результатов проведена с использованием IBM SPSS Statistics 22.0 (Armonk, USA).

Было показано, что частота встречаемости и количество опухолевых клеток с различными сочетаниями экспрессии CD44 и N-Cadherin, а также их отсутствия, у пациентов с ИКНТ увеличивались в ряду: стволовые клетки в состоянии ЭМП (у 51% (17/33) пациентов), стволовые клетки без признаков ЭМП (81% (27/33)), не стволовые клетки с признаками ЭМП (87% (29/33)), не стволовые клетки без признаков ЭМП (93% (31/33)). Результаты работы показывают, что более половины опухолевых клеток (55%) в первичной опухоли больных ИКНТ не экспрессируют маркеры мезенхимности и стволовости. Только 17% клеток являются стволовыми (по маркеру CD44) и 46% клеток находятся в состоянии ЭМП.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-75-30016.

Литература:

1. Kalluri R, Weinberg R.A. et al. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119:1420–1428.

А.С. Альдекеева, Ю.С. Крайнова

УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ МРНК БЕЛКОВ *BASP1* И *MARCKS* В ПОЧКАХ КРЫС ЛИНИИ SHR

ФБГУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

A.S. Aldekeeva, Y.S. Krainova

LEVELS OF MRNA EXPRESSION OF *BASP1* AND *MARCKS* PROTEINS IN THE SHR RATS KIDNEYS

I.P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

kardio_lab@mail.ru

В последнее время появились принципиально новые данные о структуре и функциях, которые выполняют во внутриклеточных каскадах такие важнейшие белки как протеинкиназы, в частности, протеинкиназы С (ПКС). Ключом к пониманию реакций ПКС в различных условиях могут служить изменения обмена ее основных субстратов, например белков *BASP1* и *MARCKS*. Функционирование ПКС и ее субстратов теснейшим образом связано с обменом кальция в клетке, поэтому особый интерес представляет изучение обмена ее основных субстратов в клетках крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR), у которых обнаружены генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетке. В патогенезе артериальной гипертензии, в том числе у крыс линии SHR, особая роль принадлежит почкам, поэтому мы исследовали особенности

обмена этих белков в выделительной системе. Целью нашей работы являлось выявление различий в обмене белков *BASP1* и *MARCKS* в почках крыс со спонтанной гипертензией, путем сравнения уровней экспрессии мРНК этих белков в различных структурах почек. Работа выполнена на самцах крыс линии SHR (n=8) и нормотензивных крысах линии WKY (n=8), в возрасте 90 дней. Исследование проводили на образцах ткани из коркового и мозгового слоев почек. Уровни экспрессии мРНК белков *BASP1* и *MARCKS* определяли методом ПЦР в реальном времени. Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что различия между разными структурами почек в уровнях экспрессии мРНК *BASP1* весьма значительны ($p < 0.001$), а межлинейные различия находятся на грани достоверности ($p = 0.050$). Обработка результатов по уровням экспрессии мРНК *MARCKS* также выявила существенные различия между структурами почек ($p < 0.001$), но межлинейные различия в целом практически отсутствовали. Таким образом, наши данные свидетельствуют о неравномерности распределения уровней экспрессии мРНК белков основных субстратов ПКС в различных структурах почек. Отсутствие выраженных отличий в случае *MARCKS* и слабые отличия для *BASP1* у крыс со спонтанной гипертензией и нормотензивных крыс может свидетельствовать о том, что такая неравномерность является фундаментальным фактом, не зависящим от генетически детерминированных нарушений обмена кальция в клетке.

Работа выполнена по программе РФФИ 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019-2030).

**Д.Д. Андреева, В.В. Сиренко,
О.Е. Карпичева, Ю.С. Боровиков**

ВЛИЯНИЕ БДМ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИОЗИНА С АКТИНОМ В АТФАЗНОМ ЦИКЛЕ

Институт цитологии Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Россия

**D.D. Andreeva, V.V. Sirenko,
O.E. Karpicheva, Y.S. Borovikov**

EFFECTS OF BDM ON THE MYOSIN AND ACTIN INTERACTION IN THE ATPASE CYCLE

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

borovikov@incras.ru

Врожденные миопатии представляют собой гетерогенную группу заболеваний скелетной мышечной ткани человека, характеризующихся мышечной гипотонией и слабостью. Они могут иметь широкий спектр клинических фенотипов, что крайне затрудняет разработку подходов к их лечению. Существует несколько применяемых в клинике или проходящих клинические исследования лекарственных препаратов для лечения сердечных миопатий, механизм действия которых можно использовать для лечения и скелетных миопатий. Одним из таких агентов является 2,3-бутандион моноксим (БДМ), некокурентный ингибитор АТФазной активности миозина [1], использующийся для подавления острых повреждений миокарда [2]. Однако молекулярные механизмы ингибирования БДМ миозина практически не изучены, поэтому целью данной работы было исследовать влияние этого агента на взаимодействие миозина с актином при моделировании нескольких стадий АТФазного цикла.

Настоящая работа была выполнена на одиночных скелетных мышечных волокнах, лишенных миозина и регуляторных белков (на теневых волокнах), которые получали согласно методике, описанной ранее [3]. Миозин выделяли из скелетных мышц кролика [4] и с помощью α -химотрипсина расщепляли до субфрагмента-1 миозина (S1) [3]. S1 модифицировали флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS согласно методике Борейдо с соавторами [5]. Информацию о влиянии БДМ на взаимодействие миозина с актином получали путем анализа поляризованной флуоресценции 1,5-IAEDANS, введенного в S1 [3]. Измерения поляризованной флуоресценции осуществляли при моделировании нескольких стадий АТФазного цикла в отсутствие или в присутствии 3 мМ MgADP, 15 мМ MgAMPPNP, 15 мМ MgATP γ S, 3 мМ MgATP [6] и 20 мМ БДМ.

Было показано, что БДМ в цикле гидролиза АТФ усиливает жесткость связывания миозина с актином при моделировании слабых форм миозина с актином, что может замедлить переход актомиозина из состояния А•ADP-Pi в состояние А•ADP. Было предположено, что ингибирование сброса неорганического фосфата из активного центра миозина в АТФазном цикле является одной из причин ингибирования сократительной функции мышечного волокна и АТФазной активности миозина в присутствии БДМ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00523.

Литература:

- Ostap E.J. Muscle Res. Cell Motil. 23, 305–308 (2002).
- Stringham J. et al. Ann. Thorac. Surg. 54, 852–860 (1992).
- Borovikov Y. et al. Biochim. Biophys. Acta 1794, 985–994 (2009).
- Иванов И. & Юрьев В. Биохимия и патобиохимия мышц. (1961).
- Borejdo J. et al. J. Mol. Biol. 158, 391–411 (1982).
- Kakol I. et al. Biochim. Biophys. Acta 913, 1–9 (1987).

Н.А. Басалова^{1,2}, Е.С. Новоселецкая^{1,2},
О.А. Григорьева¹, П.П. Нимирицкий^{1,2},
П.И. Макаревич^{1,2}, А.Ю. Ефименко^{1,2}

ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС, ПРОДУЦИРОВАННЫЙ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ, КАК МОДЕЛЬ ПРОФИБРОТИЧЕСКОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ IN VITRO

¹ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

N.A. Basalova^{1,2}, E.S. Novoseletskaia^{1,2},
O.A. Grigorieva¹, P.P. Nimiritsky^{1,2},
P.I. Makarevich^{1,2}, A.Yu. Efimenko^{1,2}

DECELLULARIZED EXTRACELLULAR MATRIX PRODUCED BY STROMAL CELLS AS A MODEL OF PROFIBROTIC MICROENVIRONMENT IN VITRO

¹ Institute for regenerative medicine, Medical Research and Education Center,

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

natalia_ba@mail.ru

При прогрессировании фиброза основную роль играют сигналы, поступающие от микроокружения клеток. Одним из ключевых модуляторов данного процесса является внеклеточный матрикс (ВКМ), который нарабатывается преимущественно стромальными клетками, в первую очередь, фибробластами. На сегодняшний день не существует полноценной *in vitro* модели, воспроизводящей профиброгенные свойства ВКМ, для выяснения его роли в патогенезе фиброза. Поэтому целью данного исследования было создание *in vitro* модели с участием ВКМ, функционально и структурно имитирующей профиброзное микроокружение.

Для стимуляции продукции ВКМ в течение 2 недель культивировали дермальные фибробласты человека в виде клеточных пластов в присутствии аскорбиновой кислоты, фетальной бычьей сыворотки (ФБС) или лизата тромбоцитов, а также с или без добавления TGF β . Полученные мультиклеточные структуры были децеллюляризованы с использованием ранее разработанного протокола (CHAPS, ДНКаза I). Состав и структура полученного децеллюляризованного ВКМ (дВКМ) были охарактеризованы с помощью СЭМ, ИЦХ и дот-блоттинга на маркеры профиброзного матрикса. Мезенхимные стромальные клетки человека (МСК) культивировали на дВКМ для оценки его функциональной активности; анализировали в данных клетках экспрессию маркеров, ассоциированных с фиброзом, и фиброз-ассоциированный профиль мРНК.

Среди протоколов формирования профиброгенного внеклеточного матрикса оптимальными оказались условия культивирования фибробластов в присутствии ФБС и аскорбиновой кислоты. Полученный дВКМ имел трехмерную сетчатую структуру, схожую с ВКМ в многоклеточных пластах. Такой дВКМ содержал повышенный уровень EDA-FN и высокое соотношение коллагена I типа к III. Интересно, что добавление TGF β не оказало существенного влияния на отложение профиброгенных белков ВКМ, что может указывать на главенствующую роль источника ВКМ (фибробласты) по сравнению с условиями культивирования. МСК, культивированные на дВКМ, сохраняли веретенообразную морфологию, сходную с их формой в стромальных тканях. В этих клетках было выявлено увеличение экспрессии маркеров, ассоциированных с фиброзом (EDA-FN, альфа-гладкомышечный актин), и специфические изменения секрета (снижение секреции антифибротического фактора HGF и повышение секреции профибротических факторов SPARC и фибулина-2). Более того, профиль мРНК в таких МСК также сместился в сторону профибротического паттерна.

Таким образом полученный дВКМ может быть использован для имитации и изучения профибротического микроокружения *in vitro*. Данные результаты могут быть применены в дальнейших исследованиях, посвященных изучению влияния микроокружения на восстановление и регенерацию тканей.

Исследование проводилось с использованием биоматериалов, полученных в рамках проекта МГУ им. М.В. Ломоносова «Ноев ковчег» и при поддержке РФФИ (грант № 19-29-04172).

Э.В. Бенагуев¹, И.А. Владимиров²,
О.А. Павлова², Д.И. Богомаз^{1,2}

**ТОЧНЫЙ И ЭКОНОМИЧЕСКИ
ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ГЕНОТИПИРОВАНИЯ
ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА
С ПОМОЩЬЮ ПЦР-РВ**

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого

² ООО «Бигль»

E.V. Benaguev¹, I.A. Vladimirov²,
O.A. Pavlova², D.I. Bogomaz^{1,2}

**FAITHFUL AND ECONOMICALLY EFFECTIVE
METHOD OF GENOTYPING SINGLE
NUCLEOTIDE POLYMORPHISM, USING RT-PCR**

¹ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic
University

² ООО "Bigl"

eric101@rambler.ru

Генотипирование однонуклеотидного (SNP) полиморфизма является широко распространенной задачей, особенно для медицинской, ветеринарной генетики и для диагностики наследственных заболеваний. Поточный анализ SNP требует снижения себестоимости и повышения производительности. Метод ПЦР в реальном времени, благодаря простоте проведения анализа, относительной дешевизне и низкому риску контаминации, пользуется заслуженной популярностью. Однако, наиболее широко применяемый подход с использованием реакции с двумя отжигающимися на один сайт аллель-специфичными TaqMan-зондами, помеченными разными флюорофорами, имеет ряд серьезных недостатков. Первый заключается в сравнительно низкой специфичности, которая у систем, выполненных по подобной схеме, часто оказывается низка (вплоть до полной неработоспособности). Как правило, это решается введением в зонд сложных модификаций, повышающих специфичность – MGB или LNA-нуклеотидов, что сильно повышает стоимость. Неизбежное укорочение зонда, связанное с применением «горячих» LNA-нуклеотидов, повышает количество неспецифических мишеней в геномной ДНК. Неодинаковая эффективность работы зондов с различными красителями усложняет анализ результатов.

Нами предлагается модификация метода, позволяющая добиться более высокой специфичности, чем при применении LNA и других дорогих модификаций. Детекция наличия каждой из аллелей производится в отдельном реакционном объеме, содержащем компоненты реакционной смеси, праймеры, зонд с красителем FAM, комплементарный одной из аллелей, и олигонуклеотид – заглушку, комплементарный другой аллели. Разделение реакции на два независимых объема дает новые степени свободы, позволяющие добиться тонкой настройки тест-систем для достижения максимальной специфичности. Основным фактором радикального повышения специфичности – кратное увеличение количества заглушки относительно количества зонда, что принципиально невозможно в обычных системах, где зонды смешаны эквимолярно. Кроме того, тест-системы на обе аллели в предлагаемом варианте снабжены одним и тем же красителем. Стоимость заглушек очень мала – они представляют собой стандартный олигонуклеотид с заблокированным 3'-концом. Предложенный подход применили для создания диагностических систем на гены PKLR и GLB1 домашней кошки для поиска мутантных аллелей, вызывающих наследственные заболевания

(дефицит пируваткиназы и ганглиозидоз первого типа соответственно). Значения эффективности специфической и неспецифической реакции по всем тест-системам не перекрываются друг с другом, что позволяет точно генотипировать образцы всех трех типов (гомозиготы по нормальной и мутантной аллели и гетерозиготы).

А.В. Бернадо¹, К.И. Давлетова^{1,2},
А.А. Студеникина¹

**ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
HLDF НА ПРОДУКЦИЮ БЕЛКОВ
И ЦИТОКИНОВ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

¹ Новосибирский государственный медицинский
университет, Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский институт молекулярной
биологии и биофизики – структурное
подразделение ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия

A.V. Bernado¹, K.I. Davletova^{1,2}, A.A. Studenikina¹

**INFLUENCE OF THE HLDF DIFFERENTIATION
FACTOR ON PROTEINS AND CYTOKINES
PRODUCTION IN BREAST DISEASES**

¹ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk,
Russia

² Institute of Molecular Biology and Biophysics –
subdivision of FRC FTM, Novosibirsk, Russia

idontbelive69@mail.ru

Оценивали влияние фактора дифференцировки HLDF на продукцию белков и цитокинов при заболеваниях молочной железы. Материалом служили биоптаты ткани и кровь 17 пациентов с незлокачественными заболеваниями молочной железы (НЗЗ) и 50 пациентов – с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа (ИКНТ). В супернатантах, полученных после инкубации биоматериала в среде DMEM-12 (спонтанная продукция), и в среде DMEM-12 с HLDF, определяли концентрации цитокинов: IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF, MCP-1 и белков: гистидибогатого гликопротеина (HRG), ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1), Е-кадгерина (CDH1), рецептора эстрогена α (ER α), рецептора прогестерона (PGR). Индекс влияния HLDF на продукцию белков и цитокинов высчитывали по формуле: $IBHLDF = A/B$, где А – концентрация в супернатанте после инкубации материала с HLDF, а В – концентрация при спонтанной продукции. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна-Уитни. Рассчитывали коэффициент ранговой корреляции по Спирмену (r). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

У пациентов с ИКНТ были выше IBHLDF на продукцию IL-6 ($p = 0,030$) и IL-1 β ($p = 0,021$) клетками крови, а также на продукцию IFN- γ ($p = 0,046$) биоптатами, но ниже на продукцию CDH1 ($p = 0,0004$) биоптатами по сравнению с НЗЗ. Были обнаружены корреляционные связи между IBHLDF на продукцию биоптатами следующих белков и цитокинов: HRG и IL-2 ($r = -0,389$), IL-17 ($r = -0,424$); PAI-1 и IL-6 ($r = -0,405$), IL-18 ($r = -0,385$), GM-CSF ($r = -0,357$), MCP1 ($r = -0,365$); ER α и INF- γ ($r = -0,405$), IL-12 ($r = -0,561$); PGR и G-CSF ($r = -0,371$), IL-12 ($r = -0,440$). Также были обнаружены корреляционные связи между IBHLDF на продукцию белков биоптатами и цитокинов клетками крови, а именно: CDH1 и IL-10 ($r = -0,415$), IL-17 ($r = -0,407$), IL-18 ($r = -0,428$); PAI-1 и IL-17 ($r = -0,511$);

PGR и IL-18 ($r=0,525$), TNF- α ($r=0,412$), G-CSF ($r=0,435$). Полученные корреляционные связи указывают на сопряженность продукции белков и цитокинов при злокачественной трансформации молочной железы.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (№ АААА-А18-118030790008-7).

А.А. Богданова^{1,2}

ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫЕ МАКРОФАГИ ПРИ ВПЧ-ПОЗИТИВНЫХ ОПУХОЛЯХ ГОЛОВЫ И ШЕИ

¹ *Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия*

² *Институт биологии КарНЦ РАН, Петрозаводск, Россия*

A.A. Bogdanova^{1,2}

TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES AT HPV-POSITIVE CANCER OF HEAD AND NECK

¹ *Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia*

² *Institute of Biology of KarNC RAS, Petrozavodsk, Russia*

arinabogdanova94@mail.ru

Опухоли головы и шеи (ОГШ) занимают 7-е место среди всех типов онкологических заболеваний в мире, так в 2018 году было выявлено 880 тысяч новых случаев. Наиболее распространенным подтипом является плоскоклеточный рак, на который приходится около 90%. Этиологическим фактором развития ОГШ выступает вирус папилломы человека (ВПЧ). Несмотря на то, что для пациентов с ВПЧ⁺ ОГШ характерен лучший прогноз по сравнению с пациентами с ВПЧ-негативными (ВПЧ-) опухолями, общий прогноз неутешительный.

В настоящий момент в качестве терапевтической мишени рассматривают микроокружение опухолей, где основным компонентом являются иммунные клетки, и важное место занимают макрофаги, ассоциированные с опухолью (MAO). Макрофаги разделяют на две подгруппы: фенотип M1, отличающийся провоспалительной и противоопухолевой активностью, и фенотип M2, обладающий иммуносупрессивным и протуморальным действием. В физиологических условиях или под влиянием интерферона- γ , макрофаги преобразуются в фенотип M1 и продуцируют высокие уровни IL-1 β , IL-6, CXCL10, TNF α , iNOS, лейкоцитарных антигенов человека, оказывающих противоопухолевые эффекты. За дифференцировку макрофагов в M2 отвечают клетки опухоли, запускающие этот процесс через активацию CCL-2, IL6, CSF-1, PD-1/PD-L1, CD47/SIRP α . Макрофаги M2 начинают экспрессировать на высоких уровнях IL-10, IL-4, трансформирующий ростовой фактор- β (TGF β), СС-лиганды, факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) и матриксные металлопротеиназы. Это усиливает местное воспаление, способствующее прогрессированию заболевания, его метастазированию и возникновению устойчивости к терапии. Чаще всего MAO обладают характеристиками M2-фенотипа.

Для изучения популяций макрофагов используют маркеры CD68 и CD163, где первый позволяет идентифицировать все макрофаги, а CD163 — макрофаги M2. В исследовании MAO при ВПЧ⁺ раке ротоглотки было обнаружено, что внутри ВПЧ⁺ опухоли содержится большее количество CD68⁺ клеток по сравнению с ВПЧ- ($p = 0,01$).

В стромальной области такой разницы не обнаружено. В недавнем исследовании, при изучении 110 ВПЧ⁺ ОГШ, было определено, что количество CD68⁺-макрофагов было выше внутри ВПЧ⁺/p16⁺опухолей, чем в ВПЧ⁺/p16⁻ и ВПЧ⁻ опухолях ($p = 0,003$). Считается, что наличие ВПЧ способствует привлечению к опухоли макрофагов и их дифференцировке в M2, которые связаны с ответом Т-хелперов 2-го типа. Макрофаги M1 индуцируют ответ Т-хелперов 1-го типа, способствуя клиренсу ВПЧ. Вирус препятствует развитию иммунных реакций человека, подавляя активацию M1 и перенаправляя макрофаги к фенотипу M2 через TGF- β . Так, было показано, что снижение числа MAO на ВПЧ16⁺ модели ОГШ ингибирует рост опухоли за счет накопления в ней лимфоцитов.

Механизм взаимодействия между MAO и клетками ВПЧ⁺ ОГШ до сих пор полностью не установлен, и достоверно не определена их роль в прогнозе заболевания. Данное явление нуждается в дальнейшем изучении для улучшения терапии для лечения ВПЧ⁺ ОГШ.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 0752-2020-0007).

А.В. Бузенкова, Р.Х. Мухамеджанов, Л.А. Таширева

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ АССОЦИИРОВАННЫ С РАЗВИТИЕМ ЛИМФОГЕННЫХ МЕТАСТАЗОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Научно-исследовательский институт Онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия

A.V. Buzenkova, R. Kh. Mukhamedzhanov, L.A. Tashireva

MESENCHYMAL STEM CELLS ASSOCIATED WITH THE LYMPHOGENIC METASTASIS DEVELOPMENT IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia

buzenkova_av@mail.ru

Рак молочной железы (PMЖ) — самое распространенное онкологическое заболевание у женщин различных возрастных групп. Основной причиной летальных исходов при PMЖ является метастазирование [1]. Мезенхимальные стволовые клетки (MSCs) — наиболее представительная клеточная популяция из формирующих опухолевую нишу. Известно, что MSCs способны мигрировать в очаг повреждения, дифференцироваться в опухоль-ассоциированные фибробласты и секретировать проангиогенные цитокины, способствуя прогрессии опухоли [2]. Также показано, что секретлируемые MSCs белки IGFBPs оказывают прямое антипролиферативное действие на клетки опухоли. Противоречивость имеющихся данных свидетельствует о важности изучения роли MSCs в метастазировании PMЖ. В исследовании вошли 39 пациентов (ИКНТ, люминальный подтип; средний возраст: 49,08 \pm 12,19; T₁₋₄N₀₋₃M). MSCs в ткани ИКНТ определяли методом мультиплексной иммуногистохимии, используя панель антител против CD11b, CD34, CD90, CD45 и 7-colour IHC Kit (PerkinElmer, USA). Сканирование окрашенных образцов осуществлялось с помощью автоматизированной системы Vectra 3.0.3 (PerkinElmer, USA), анализ

многоцветных изображений — с помощью программного обеспечения inForm 2.1.1 (PerkinElmer, USA). Для статистической обработки данных использовали пакет программ IBM SPSS Statistics 22.0 (Armonk, USA). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Результаты исследования показали, что MSCs встречаются в ткани ИКНТ в 97,4% случаев. При этом ассоциация MSCs с лимфогенным метастазированием зависела от менопаузального статуса пациенток. Так, количество MSCs у пациенток с сохраненной менструальной функцией не было связано с лимфогенным метастазированием ($p=0,024$). Однако у пациенток в постменопаузе количество MSCs было значимо большим в группе с наличием лимфогенных метастазов (71,0 [64,0–102,0]) по сравнению с пациентками, у которых лимфогенные метастазы отсутствовали (30,0 [10,0–56,00]) ($p=0,038$).

В работе приводятся результаты исследований, реализованных в рамках гранта РФФИ (№ 19-75-30016).

Литература:

1. Barcellos-Hoff M., Lyden D. et al. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(7): 511–518.
2. Cabarcas S., Mathews L. et al. The cancer stem cell niche—there goes the neighborhood? *International Journal of Cancer* 2011; 129(10): 2315–2327.

**В.Ю. Васильева, А.В. Сударикова,
Е.А. Морачевская, Ю.А. Негуляев,
В.И. Чубинский-Надеждин**

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ СЕЛЕКТИВНЫХ АКТИВАТОРОВ КАНАЛОВ PIEZO1 НА МЕМБРАННЫЕ ТОКИ В КЛЕТКАХ K562

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

V.Y. Vasileva, A.V. Sudarikova, E.A. Morachevskaya,
Y.A. Negulyaev, V.I. Chubinskiy-Nadezhdin

COMPARATIVE ANALYSIS OF SELECTIVE PIEZO1 ACTIVATORS ON MEMBRANE CURRENTS IN K562 CELLS

Institute of cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

vasileva.valerija@gmail.com

Ионные каналы, функционирование которых зависит от механического состояния клетки, называются механочувствительными или механочувствительными (МЧК). МЧК принимают участие во множестве физиологических и сигнальных процессах в клетках млекопитающих. Особый интерес представляют кальций-проницаемые МЧК, так как именно они способны конвертировать механические стимулы в высоко-локализованные кальциевые сигналы, тем самым управляя активностью различных кальций-зависимых молекул. Особым прорывом в механобиологии было открытие новых механочувствительных канальных белков, названных Piezo1 и Piezo2, не имеющих гомологии ни с одними ранее известными ионными каналами. В дальнейших исследованиях было показано участие каналов Piezo во множестве ключевых клеточных реакций как в норме, так и при патологиях, включая онкотрансформацию. В 2015 впервые был обнаружен низкомолекулярный Piezo1-селективный химический активатор — гетероциклическое соединение Yoda1. Позже в 2018 году был идентифицирован еще один селективный стимулятор

активности каналов Piezo1 — Jedi2. Важно, что оба соединения не приводят к стимуляции каналов Piezo2, несмотря на близкую гомологию между белками. Таким образом, стало ясно, что в природе могут потенциально существовать молекулы, способные управлять активностью каналов Piezo1 в отсутствие механических стимулов. В настоящей работе исследовали действие двух химических активаторов Piezo1 на ионные токи в плазматической мембране клеток миелоидной лейкемии человека K562. Клетки K562 — уникальная клеточная модель, позволяющая регистрировать одиночные ионные каналы при отведении от всей клетки (конфигурация whole-cell). Функциональная экспрессия Piezo1 в клетках K562 была подтверждена методом ОТ-ПЦР и иммунофлуоресцентным окрашиванием. Далее с помощью метода патч-кламп в конфигурации whole-cell было проанализировано действие селективных низкомолекулярных активаторов Yoda1 и Jedi2 на одиночные ионные токи в клетках K562. Были определены биофизические характеристики одиночных каналов, оценена дозозависимость действия агонистов. С помощью варьирования ионного состава экспериментальных растворов зарегистрированы кальциевые токи, переносимые каналами Piezo1. Таким образом, впервые показана проницаемость каналов Piezo1 для ионов кальция.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 19-75-00046 (Чубинский-Надеждин В.И., Васильева В.Ю.) и грантом РФФИ № 19-015-00211 (Сударикова А.В.).

Г.В. Васильева, Д.Г. Тентлер

СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ TG2

*Институт Цитологии Российской Академии Наук,
Санкт-Петербург, Россия*
G. Vasileva, D. Tentler

CONSTRUCTION OF THE REPORTER SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF TG2 INHIBITORS

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences,
Saint Petersburg, Russia*

vip.giomar@mail.ru

Трансглутаминаза 2 (TG2) — мультифункциональный белок, который экспрессируется в разных тканях организма. Было показано, что ферментативная активность TG2 играет роль в клеточном ответе на протеотоксический стресс. В частности, она способствует тримеризации HSF1, тем самым обеспечивая его способность связываться с HSE элементами в промоторных участках группы генов теплового шока. Кроме того, продемонстрировано, что ферментативная активность TG2 необходима для развития гепатоцеллюлярной карциномы, что делает её потенциальной терапевтической мишенью. Целью работы было создание тест-системы для поиска ингибиторов TG2, основанной на регуляции активности HSF1.

Для анализа транскрипционной активности HSE нами была сконструирована репортерная плаزمиды, содержащая ген CLuc (*Cypridina Luciferase*) под контролем промотора с HSE элементами. Использование секретируемой люциферазы позволяет оценить уровень активности HSF1 путём отбора культуральной среды. Для оценки зависимости экспрессии люциферазы от активности трансглутаминазы 2 эксперименты проводились на клеточных линиях MEF и Huh7 с нокаутом гена TG2 (TG2 KO) либо с TG2 дикого типа (wt). Поскольку эффективность трансфекции может варьировать в зависимости от условий, для

стандартизации результатов были получены постоянные клеточные линии с репортерной плазмидой. Далее клетки подвергались тепловому шоку, и через определённые промежутки времени проводились измерения активности люциферазы. В результате наблюдалось значительное её повышение в ответ на температурное воздействие при наличии в клетках TG2. Предполагается, что в отсутствие или при ингибировании TG2 способность HSF1 регулировать адаптацию должна быть резко снижена, что должно выражаться в пониженной экспрессии гена CLuc после теплового шока. Таким образом, данный метод позволяет в дальнейшем точно и сравнительно просто проводить поиск ингибиторов транскриптазы 2 на готовых клеточных линиях по отработанному протоколу.

О.В. Ветровой^{1,2}, П.П. Нибирицкий³, Е.В. Ломерт⁴

РОЛЬ HIF1-ЗАВИСИМОЙ СУПРЕССИИ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО В ПАТОГЕНЕЗЕ ПОСТГИПОКСИЧЕСКОЙ РЕОКСИГЕНАЦИИ МОЗГА

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт Физиологии им. И.П. Павлова» Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Российская Федерация

³ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, ФГБОУ ВО Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт Цитологии» Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация

O.V. Vetrovoy^{1,2}, P.P. Nimiritsky³, E.V. Lomert⁴

ROLE OF HIF1-DEPENDENT PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY SUPPRESSION IN THE PATHOGENESIS OF POST-HYPOXIC REOXIGENATION IN HE BRAIN

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

³ Institute for Regenerative Medicine, Medical research and education center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

vov210292@yandex.ru

Пентозофосфатный путь (ПФП) метаболизма глюкозы представляет собой ключевой источник НАДФН в мозге. НАДФН является незаменимым субстратом ферментативных реакций, направленных на поддержание эффективной антиоксидантной защиты и предотвращение окислительного стресса. В настоящей работе показано, что тяжелая гипобарическая гипоксия (ТГ), создаваемая *in vivo* на крысах линии Wistar, и последующая реоксигенация, вызывающие краткосрочное увеличение количества регуляторной альфа субъединицы HIF1

(HIF1 α) в CA1 поле гиппокампа, индуцирует снижение количества и активности Г6ФДГ и количества НАДФН, что сопровождается окислительным стрессом и запуском апоптоза. Инъекция ингибитора HIF1 топотекана перед ТГ предотвращает увеличение количества HIF1 α , снижает экспрессию белкового продукта транскрипционной активности HIF1, эритропоэтина, нормализуя количество и активность Г6ФДГ и увеличивая уровень НАДФН, что сопровождается нормализацией окислительно-восстановительного статуса и снижением свободнорадикального окисления в гиппокампе, а также предотвращением апоптотических процессов и гибели нейронов. Кроме того, с применением модели умеренной гипобарической гипоксии *in vivo* выявлена обратная связь между активностью гипоксия индуцируемого фактора-1 (HIF1) и количеством мРНК Г6ФДГ. Универсальность открытого механизма HIF1-зависимой негативной регуляции экспрессии Г6ФДГ подтверждена в *in vitro* экспериментах на культуре клеток НЕК человека, трансфицированной люциферазой под HIF-зависимым промотором. Полученные данные расширяют современные представления о механизмах постгипоксических форм патологии. Использование ингибиторов HIF1 или индукторов ПФП в ранний постинсультный период может быть рассмотрено в качестве эффективной стратегии коррекции постинсультных состояний в клинической практике.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00336. Исследования осуществлены с использованием оборудования ресурсных центров «обсерватория экологической безопасности» и «развитие молекулярных и клеточных технологий» научного парка СПбГУ.

М.А. Виговский, О.А. Григорьева, Н.А. Александрюшкина, Н.А. Басалова, М.А. Кулебякина, А.Ю. Ефименко
РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК ПРИ ПАТОГЕНЕЗЕ ФИБРОЗА

Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

M.A. Vigovsky, O.A. Grigorieva, N.A. Alexandrushkina, N.A. Basalova, M.A. Kulebyakina, A.Yu. Efimenko

THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN CELL TRANSDIFFERENTIATION IN THE PATHOGENESIS OF FIBROSIS

Institute for regenerative medicine, Medical research and educational center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

vigovskiy_m.a@mail.ru

Обширное или хроническое повреждение тканей зачастую разрешается с потерей или ослаблением функции органа из-за патологического накопления внеклеточного матрикса (ВКМ) и развитием фиброза. Известно, что в построении ВКМ важную роль играют миофибробласты, пул которых пополняется в процессе трансдифференцировки клеток эндотелия сосудистого русла в стромальные клетки путем эндотелиально-мезенхимного перехода (эндоМП). Одним из стимуляторов данного процесса считается трансформирующий фактор роста (TGF β), однако ряд

последних работ указывает на комплексность эндоМП. Так возникает необходимость выяснения роли возможных комплементарных факторов, таких как взаимодействие с окислителями, возможное в ходе воспалительной реакции, при котором происходит накопление интермедиантов кислорода и развитие окислительного стресса клеток.

Целью нашей работы стала оценка роли окислительного стресса в запуск процесса эндоМП.

Мы сравнивали влияние TGF β на эндоМП с воздействием окислительного стресса, моделируемого нами добавлением в среду перекиси водорода (H₂O₂). Для моделирования процесса перехода клетки эндотелия пупочной вены человека (HUV β C) культивировали в течение четырех суток в среде с ежедневным добавлением 5 нг/мл TGF β , 100 мкМ H₂O₂ или их смеси. Для анализа трансдифференцировки клеток эндотелия в миофибробласты оценивали уровень основных маркеров миофибробластов — альфа гладкомышечного актина (α SMA), внеклеточного домена А фибронектина (EDA FN), коллагена I типа, а также в модели направленной миграции оценивали изменение подвижности клеток эндотелия.

Методом иммуноцитохимии показано, что экспрессия одного из основных маркеров миофибробластов α SMA, в клетках эндотелия увеличивается при культивировании в среде с добавлением только H₂O₂ или смеси TGF β и H₂O₂, а согласно результатам ОТ-ПЦР уровень мРНК α SMA повышался только при добавлении смеси TGF β и H₂O₂.

При этом во всех случаях сохранялась экспрессия маркера эндотелия — CD31, при этом возрастал как уровень экспрессии генов EDA-FN и коллагена I типа, так и уровень их синтеза по результатам вестерн-блот анализа. Воздействие комбинации TGF β и H₂O₂ приводило к изменению уровня подвижности HUV β C в 2 раза по сравнению с контрольными клетками, что также является признаком эндоМП.

Полученные данные свидетельствуют о способности окислительного стресса индуцировать эндотелиально-мезенхимный переход, что может вносить значительный вклад в фиброзирование тканей. При этом следует отметить, что для эффективной трансдифференцировки эндотелиоцитов недостаточно одного фактора, а требуется создание комплекса условий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-0043719.

**С.А. Владимирова^{1,2}, А.Д. Никотина¹,
Д.А. Алексеев^{1,2}, Б.А. Маргулис¹, И.В. Гужова¹.**

HSP70 СПОСОБСТВУЕТ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОМУ ПЕРЕХОДУ В КЛЕТКАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА DLD1

¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

**S.A. Vladimirova^{1,2}, A.D. Nikotina¹,
D.A. Alexeev^{1,2}, B.A. Margulis¹, I.V. Guzhova¹.**

HSP70 PROMOTES THE EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN DLD1 HUMAN COLON CANCER CELLS

¹ Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

² St. Petersburg University, Saint-Petersburg, Russia

snezhana.alexandrovna@mail.ru

Известно, что молекулярной основой метастазирования является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). В течение ЭМП эпителиальные клетки теряют пролиферативную активность, приобретают мезенхимный фенотип и способность к миграции и инвазии. Это происходит вследствие снижения экспрессии эпителиальных (E-кадгерин) и увеличения экспрессии мезенхимальных (виментин) маркеров. Изучение молекулярных механизмов ЭМП позволит выявить новые терапевтические мишени для лечения онкологических заболеваний.

Недавно в нашей лаборатории мы обнаружили вещество CL-43¹, которое может предотвращать ЭМП путем подавления активности транскрипционного фактора HSF1. Для моделирования ЭМП мы в течение недели культивировали клетки колоректального рака DLD1 на питательной среде с добавлением глюкозы (80 мМ), а для регуляции активности HSF1 использовали CL-43 в качестве ингибитора и U-133 в качестве активатора. С помощью таких методов, как вестерн-блоттинг, конфокальная микроскопия и ПЦР в реальном времени мы показали, что при увеличении активности HSF1 в клетках, выращенных на среде с добавлением глюкозы, наблюдается уменьшение уровня E-кадгерина и повышение уровня виментина. В то же время в клетках со сниженной активностью HSF1, культивируемых на среде с добавлением глюкозы, уровень E-кадгерина остается неизменным. С помощью прибора xCelligence мы оценили скорость миграции клеток в режиме реального времени. Нами было обнаружено уменьшение миграционных свойств клеток со сниженной активностью HSF1, и их увеличение в клетках с повышенной активностью HSF1 при стимуляции ЭМП высоким содержанием глюкозы. Таким образом, молекулы-активаторы HSF1 стимулируют, а его ингибиторы подавляют глюкоза-индуцированный эпителиально-мезенхимальный переход.

Поскольку одной из главной белковой мишенью HSF1 является HSP70, мы предположили, что HSP70 может играть важную роль в стимуляции ЭМП. Для регуляции активности HSP70 были взяты ингибитор шаперонной активности белка — PES, а также клеточная линия DLD1 с подавленным уровнем HSP70. Используя вышеописанные методы, мы показали, что в клетках с пониженным уровнем HSP70 наблюдается восстановление количества E-кадгерина и снижение содержания виментина по сравнению с клетками, введенными в ЭМП и, как следствие, их низкая миграционная активность.

Таким образом, можно утверждать, что HSP70 способен оказывать стимулирующее действие в процессах ЭМП, а применение его ингибиторов в терапии онкологических заболеваний позволит предотвратить метастазирование раковых клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-00973.

Литература:

1. Nikotina, A. D. *et al.* Discovery and optimization of cardenolides inhibiting HSF1 activation in human colon HCT-116 cancer cells. *Oncotarget* **9**, 27268–27279 (2018).

А.Д. Воронова¹, О.В. Степанова^{1,2},
Т.Г. Куликова¹, М.П. Валихов^{1,2}, Т.В. Кузнецова¹,
Р.А. Полтавцева³, Г.Т. Сухих³, В.П. Масенко¹

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ PPAR α В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ СЕРДЦЕ ЧЕЛОВЕКА И МИОКАРДЕ ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

¹ НМИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва

² ФГБУ ФМИЦПН им. В.П. Сербского Минздрава РФ, Москва

³ НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова МЗ РФ, Москва

A.D. Voronova¹, O.V. Stepanova^{1,2},
T.G. Kulikova¹, M.P. Valikhov^{1,2}, T.V. Kuznetsova¹,
R.A. Poltavtseva³, G.T. Sukhikh³, V.P. Masenko¹

STUDY OF PPAR α EXPRESSION LEVELS IN A DEVELOPING HUMAN HEART AND MYOCARDIUM OF PATIENTS WITH HEART FAILURE

¹ National Medical Research Centre of Cardiology, Moscow, Russia

² V.P. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia

³ FSBI "National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology was established named after Academician V.I. Kulakov", Moscow, Russia

nastyanastyav@mail.ru

Сердечная недостаточность (СН) является одной из главных причин смертности и инвалидизации во всем мире. Наиболее часто к СН приводят такие заболевания сердца, как дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) и ишемическая болезнь сердца (ИБС). Известно, что при развитии сердечной недостаточности (СН) происходит смещение кардиального энергетического метаболизма, которое заключается в сдвиге от использования жирных кислот к использованию глюкозы в качестве основного источника энергии. Главным регулятором кардиального энергетического метаболизма является ядерный рецептор PPAR α — рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, который на высоком уровне экспрессируется в кардиомиоцитах. Изменение внутриклеточного метаболизма при СН запускает процессы дедифференцировки кардиомиоцитов. При дедифференцировке кардиомиоцитов, происходящей при СН, эти клетки приобретают фенотип фетальных кардиомиоцитов, происходит реактивация фетальной генетической программы. Целью работы являлось изучение уровней экспрессии PPAR α в миокарде пациентов с ДКМП и ИБС, а также в фетальных кардиомиоцитах человека.

Методом количественной ПЦР в реальном времени были определены уровни экспрессии PPAR альфа в эндомиокардиальных биоптатах пациентов с ДКМП (n=20), в хирургическом материале ушек предсердия пациентов с ИБС (n=10), в миокарде без сердечно-сосудистых заболеваний (n=5), в фетальных кардиомиоцитах человека (n=5). В работе были использованы фетальные кардиомиоциты человека 8–9 недели гестации, предоставленные ФГБУ «НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава РФ.

В ходе выполнения работы было показано, что при СН, связанной с ИБС и ДКМП, происходит значительное снижение уровней экспрессии PPAR альфа, а самый низкий уровень экспрессии наблюдается в фетальных кардиомиоцитах человека. Впервые выявленный нами

низкий уровень экспрессии PPAR альфа в фетальных кардиомиоцитах человека подтверждает, что гликолитический метаболический фенотип характерен для недифференцированных клеток. По-видимому, именно дедифференцированные клетки вносят вклад в регулируемый PPAR альфа энергетический переход при СН. Дедифференцировка кардиомиоцитов, происходящая при повреждении миокарда, в том числе и при СН, может обеспечить клеткам дополнительную пластичность, не только позволяя им выживать в патологических условиях, но и повышая способность вступать в клеточный цикл и дифференцироваться затем в функциональные зрелые кардиомиоциты. Знание механизмов метаболических процессов при СН особенно важно в настоящее время, так как существующая современная лекарственная терапия СН малоэффективна и способна лишь замедлить прогрессирование этого тяжелого заболевания. Развитие метаболической терапии представляется перспективным направлением в кардиологии.

Работа выполнена при поддержке РФФИ: грант № 18-015-00198.

С.М. Вострикова, А.Б. Гринев

ВЛИЯНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО АНАЛОГА ВИТАМИНА Е НА ГИБЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ИНДУЦИРОВАННУЮ ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩИМИ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

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

S.M. Vostrikova, A.B. Grinev

THE EFFECT OF A WATER-SOLUBLE ANALOG OF VITAMINE E ON TUMOR CELL DEATH INDUCED BY DNA-DAMAGING CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

vostrikova.sofya@yandex.ru

В противоопухолевой терапии широко применяются препараты, направленные на повреждение ДНК. В ряде случаев это сопровождается накоплением активных форм кислорода (АФК), что приводит к возникновению нарушений не только в опухолевых, но и

в здоровых клетках. Воздействие таких препаратов на нормальные ткани ограничивает их применение в противоопухолевой терапии. Антиоксиданты способны детоксицировать АФК, что, с одной стороны, должно повышать устойчивость как опухолевых, так и неопухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам. С другой стороны, АФК играют ключевую роль в метастазировании опухолей, и использование антиоксидантов может позволить избежать этого процесса. Несмотря на большое количество исследований в данной области, вопрос об эффективности использования антиоксидантов в противоопухолевой терапии до сих пор остается дискуссионным.

В данной работе исследовали влияние антиоксиданта тролокса (водорастворимого аналога витамина Е) на гибель клеток легочной аденокарциномы (A549) и карциномы яичников (Caov4) как дикого типа, так и с нокаутом по каспазе-2. Для стимуляции гибели использовали препараты, повреждающие ДНК: цисплатин, этопозид

и доксорубин. Клетки инкубировали как в присутствии антиоксиданта тролокса, так и без него. Повреждение ДНК оценивали по накоплению фосфорилированной формы гистона H2AX, а также по аккумуляции транскрипционного фактора p53 в ответ на повреждение ДНК. О гибели клеток судили по процессингу (активации) каспазы-2, -8, -3, а также по расщеплению поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP), субстрата каспазы-3. Оценку проводили с использованием электрофореза в полиакриламидном геле с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану и обработкой соответствующими антителами.

Результаты показали, что тролокс не оказывает существенного влияния на гибель используемых в работе клеток. Учитывая более высокое содержание АФК в клетках опухоли, можно предположить, что использование тролокса позволит снизить цитотоксичность ДНК-повреждающих препаратов для клеток нормальных тканей, не затрагивая их способность вызывать гибель опухолевых.

Д.В. Гаврилов¹, О.В. Галибин², Э. Питкин³,
Н.М. Юдинцева⁴, М.И. Блинова⁴,
М.Р. Питкин⁵, М.А. Шевцов^{2, 4, 6}

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОРИСТЫХ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ С СЕРЕБРЯНЫМ ПОКРЫТИЕМ ДЛЯ ЭНДО-ЭКЗО ПРОТЕЗИРОВАНИЯ КОНЕЧНОСТЕЙ

¹ ФГБУ «Федеральный научный центр реабилитации инвалидов им Г.А. Альбрехта» Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Российская Федерация

³ Wharton School, University of Pennsylvania, Филадельфия, США

⁴ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Tufts University School of Medicine, Бостон, США

⁶ Technical University of Munich (TUM), Мюнхен, Германия

D. Gavrilov¹, O. Galibin², E. Pitkin³, N. Yudincheva⁴,
M. Blinova⁴, M. Piktin⁵, M. Shevtsov^{2, 4, 6}

SILVER COATED POROUS TITANIUM IMPLANTS IN DIRECT SKELETAL ATTACHMENT OF ENDO-EXO PROSPHESIS

¹ "Federal Scientific Center of Rehabilitation of the Disabled named after G.A. Albrecht" of the Ministry of Labour and Social Protection of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russian Federation

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russian Federation

³ Wharton School, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, United States

⁴ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (RAS), Saint-Petersburg, Russian Federation

⁵ Tufts University School of Medicine, Boston, MA, United States

⁶ Technical University of Munich (TUM), Munich, Germany

dr.gavrilovdv@gmail.com

Введение. Инфекционные осложнения являются одной из основных причин несостоятельности внутрикостных имплантатов конечностей.

Цель. Оценка антибактериальных и биоинтегративных свойств серебряного покрытия внутрикостных

имплантатов в модели чрескожной интеграции титановых штифтов у карликовых свиней.

Материалы и методы. Пористые титановые Ti6Al-4V имплантаты были покрыты серебряной микроплёнкой с использованием метода физического осаждения из паровой фазы. С применением методов сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), МТТ-теста, анализа продукции матричных металлопротеиназ (MMP-1, MMP-2, MMP-9) проводилось исследование цитотоксичности имплантатов и адгезионных свойств клеток (дермальные фибробласты, мезенхимальные стволовые клетки). При микробиологическом анализе оценивались параметры адгезии и образования биоплёнок бактериальных штаммов (*St. aureus*, *S. epidermidis*, *S. aeruginosa*). Состоятельность интерфейса «кожа-имплантат» оценивалась на модели чрескожной имплантации титанового стержня карликовым свиньям (n=2) с последующим биохимическим исследованием крови и мочи животных и гистологическим анализом титанового стержня в дермальном блоке.

Результаты. Использование серебряного напыления не оказывало токсического воздействия и не приводило к снижению адгезионных свойств и функциональной активности клеток. При *in vitro* анализе имплантатов (по данным СЭМ) наблюдалось формирование межклеточных контактов и монослоя клеток на поверхности и в порах стержня. Микробиологические исследования продемонстрировали, что серебряное покрытие значительно замедляло формирование бактериальных плёнок на поверхности имплантатов. При исследованиях *in vivo* отмечалось отсутствие послеоперационных осложнений по данным клинического наблюдения и рентгенологического исследований у всех животных (n=2) в течение 6 месяцев наблюдения. При гистологическом анализе чрескожного интерфейса была подтверждена интеграция мягких тканей с поверхностью титанового штифта без признаков воспаления.

Выводы. Комбинация пористой конструкции имплантатов с нанесением антибактериального серебряного покрытия обеспечивает оптимальные условия минимизации рисков инфекционных послеоперационных осложнений. Применение данного покрытия в дальнейших доклинических и клинических исследованиях позволит снизить риск повторных операций и будет способствовать приживлению чрескожного имплантата.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-08-00024.

А.О. Гайдамака, М.Ю. Кордюкова, А.И. Калмыкова ВЛИЯНИЕ ТЕЛОМЕРНОЙ ДИСФУНКЦИИ НА БИОГЕНЕЗ ЦЕНТРОСОМ В ЯИЧНИКАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН,
Москва

A. Gaidamaka, M. Kordyukova, A. Kalmykova THE EFFECT OF TELOMERE DYSFUNCTION ON CENTROSOME BIOGENESIS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* OVARIES

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy
of Sciences, Moscow

stadtrand@yandex.ru

Теломеры представляют собой комплекс нуклеиновых кислот и белков, защищающих концы хромосом эукариот от деградации и слияния. Дисфункция теломер

чревата нарушениями развития и возникновением раковых клеток. Теломеры *Drosophila melanogaster* поддерживаются с помощью ретротранспозиций мобильных элементов *HeT-A*, *TAHRE* и *TART*, экспрессия которых контролируется через Piwi-interacting РНК (piРНК) путь. Нокдаун компонентов piРНК пути в яичниках дрозофилы приводит к дисфункции теломер и нарушению раннего развития. При дисфункции происходит усиление экспрессии основного теломерного ретротранспозона — *HeT-A*, что приводит к накоплению его транскриптов и белков в яичниках и ранних эмбрионах в виде рибонуклеопротеиновых (РНП) комплексов. В эмбриональном синцитии *HeT-A* РНП локализованы вблизи centrosом. Масс-спектрометрический анализ белков, взаимодействующих с белком *HeT-A* Gag в эмбрионах дрозофилы, выявил киназы Polo и Cdk1, которые являются ключевыми регуляторами клеточного цикла и биогенеза centrosом. Этот результат указывает на связь между накоплением теломерных РНП при дисфункции теломер и митотическими нарушениями в эмбрионах. Было предположено, что нарушение сборки материнских centrosом может происходить в процессе оогенеза, приводя к ранней остановке развития.

Целью данной работы было изучение влияния теломерной дисфункции на локализацию и функцию centrosом в оогенезе дрозофилы. Методом ко-иммунопреципитации показано, что *HeT-A* Gag взаимодействует с Polo в яичниках. Затем методом иммуоокрашивания белков centrosом γ -тубулина и centrosомина (CNN) мы изучили локализацию и структуру centrosом в яичниках дрозофилы в норме и при дисфункции теломер, вызванной нокдауном компонента piРНК пути *spnE*. Известно, что в норме на ранних стадиях оогенеза *D. melanogaster* centrosомы в ооците формируют крупный центр организации микротрубочек (ЦОМТ). Затем снижение уровня Polo ведет к уменьшению числа centrosом в позднем оогенезе, в результате чего зрелый ооцит не содержит centrosом. Гиперэкспрессия *HeT-A* приводит к атипичной локализации centrosом и изменению их структуры. На ранних и поздних стадиях оогенеза показана колокализация ЦОМТ и *HeT-A* Gag в ооцитах с нокдауном *spnE*. На поздних стадиях оогенеза ЦОМТ более крупный и имеет рыхлую структуру. Полученные результаты указывают на то, что теломерная дисфункция в яичниках дрозофилы вызывает нарушение биогенеза centrosом, что, по-видимому, является причиной остановки развития.

А.В. Глинских^{1,2,3}, А.Е. Акулов^{1,2,3}

МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-ГО ТИПА НА МОЗГ МЫШЕЙ ЛИНИИ NOD SCID

¹ Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Международный Томографический Центр СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

A.V. Glinskikh^{1,2,3}, A.E. Akulov^{1,2,3}

METABOLOMIC ANALYSIS OF THE IMPACT OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS ON THE BRAIN OF NOD SCID MICE

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² International Tomographic Center SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

gliniskikh@gmail.com

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) относится к группе метаболических заболеваний, в основе которых лежит нарушение углеводного обмена. Без заместительной терапии диабет 1-го типа быстро прогрессирует и приводит к возникновению тяжёлых осложнений, одним из которых является диабетическая энцефалопатия (ДЭ). Развитие ДЭ вызывает повреждение центральной нервной системы и появление когнитивных расстройств. Оперативная диагностика последствий СД1 позволяет начать терапию на ранних стадиях болезни и минимизировать воздействие осложнений на организм. Широко применяемым методом ранней диагностики метаболических заболеваний является метаболомный анализ с применением ЯМР спектроскопии.

В данной работе исследование сахарного диабета 1-го типа было выполнено на лабораторных мышах линии NOD SCID, а в качестве модели СД1 применялась химически-индуцированная модель с введением стрептозотоцина. Несмотря на то, что лабораторные мыши являются наиболее востребованным объектом в биомедицинских исследованиях, анализ метаболомного профиля биологических тканей лабораторных мышей в модели СД1 ранее не проводился. Особый интерес представляет воздействие СД1 на центральную нервную систему, поэтому в качестве объектов для ЯМР анализа были выбраны образцы ткани головного мозга мышей.

Для исследования влияния СД1 на метаболомный профиль ткани головного мозга было подготовлено по 7 образцов в группах контроль/диабет для каждого пола (всего 28 образцов). Методика приготовления биологических образцов с использованием трехкомпонентной смеси хлороформ/вода/метанол позволила свести к минимуму искажение базовой линии в спектрах ЯМР от широких сигналов макромолекул. Методом спектроскопии ЯМР были идентифицированы более 50 метаболитов ткани головного мозга мышей линии NOD SCID. В результате сравнения концентраций метаболитов групп контроль и СД1 с применением t-теста Стьюдента были найдены достоверные изменения концентрации глутамина и лактата как для самцов, так и для самок с СД1. Применение многомерного PLS-DA анализа позволило определить, как каждая группа реагирует на СД1 не только по отдельным метаболитам, но и по их интегральной совокупности.

Данное исследование предоставляет новые знания о влиянии СД1 на метаболизм головного мозга мышей и демонстрирует эффективность применения спектроскопии ЯМР для дальнейшего развития метабомики.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке бюджетного проекта № 0259-2019-0004-С-01.

Ю.А. Гненная¹, М. Piacentini², Н.А. Барлев¹
ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ТРАНСГЛУТАМИНАЗЫ
2 С ТРАНСКРИПЦИОННЫМ ФАКТОРОМ
Р73 В КОНТЕКСТЕ ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЯ

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
² University of Rome "Tor Vergata", Рим, Италия

Y.A. Gnennaya¹, M. Piacentini², N.A. Barlev¹

STUDY OF THE INTERACTION OF THE
TRANSLUTAMINASE 2 WITH THE
TRANSCRIPTION FACTOR P73 IN THE
CONTEXT OF TUMOR FORMATION

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia
² University of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy

gnennaya1996@mail.ru

Трансглутаминаза 2 (TG2) — это консервативный Ca²⁺-зависимый мультидоменный фермент, принадлежащий семейству трансглутаминаз, который обладает рядом активностей, таких, как: трансамидазная, серин-треонин-киназная, дисульфидизомеразная, протеинкиназная, а также ГТФ- и АТФ-азная. В течение последних лет было установлено, что TG2 участвует в регуляции выживания, инвазии, миграции, прогрессии и аутофагии в раковых клетках, и, как следствие, может являться инновационным биомаркером и терапевтической мишенью при различных типах рака.

Среди других онкопротеинов, так же активно вовлеченных в онкогенез, наиболее известным является транскрипционный фактор p53. По литературным данным известно, что TG2 может способствовать агрегации p53 в клетках карциномы почек, в то время как в клетках нейробластомы подавление эндогенного TG2 приводит к значительному усилению активности p53, в том числе, его фосфорилированных форм [1, 2]. Известно, что p53 имеет два гомолога — p63 и p73, которые, в совокупности, образуют семейство белков p53. Однако взаимодействие TG2 с остальными членами семейства еще не было изучено. При помощи таких методов, как иммуноблоттинг, GST-pulldown, в данной работе было продемонстрировано наличие белок-белкового взаимодействия между TG2 и белками p63 и p73. В ходе дальнейшей работы планируется детальное изучение механизмов взаимовлияния фермента TG2 и членов семейства p53, а также опосредованного влияния TG2 на интерактом данных белков.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-09144 (культуральная работа) и мегагранта в рамках научного проекта № 14.WO3.31.0029 (молекулярная работа).

Литература:

1. Nezir A. E., Ulukan, B., Telci, D. Transglutaminase 2: The Maestro of the Oncogenic Mediators in Renal Cell Carcinoma. *Medical Sciences*. 2019; 7(2): 24;

2. Tucholski, J. TG2 protects neuroblastoma cells against DNA-damage-induced stress, suppresses p53 activation. *Amino Acids*. 2010; 39(2): 523–532.

А.Д. Григорьев^{1,2}, А.Ю. Скопин²,
Л.Н. Глушанкова², Е.В. Казначеева²

ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ВХОДА КАЛЬЦИЯ,
ОПОСРЕДОВАННОГО БЕЛКАМИ
STIM2 И ORAI3

¹ Санкт-Петербургский Политехнический
 Университет Петра Великого, Санкт-Петербург,
 Россия

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

A.D. Grigoryev^{1,2}, A.Y. Skopin²,
 L.N. Glushankova², E.V. Kaznacheyeva²

SEARCH OF INHIBITORS OF CALCIUM ENTRY,
MEDIATED BY STIM2 AND ORAI3 PROTEINS

¹ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic
 University, Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Cytology Russian Academy of Science,
 Saint-Petersburg, Russia

Andreygrig425@gmail.com

Кальций, как вторичный мессенджер, играет ключевую роль во многих функциях эукариотических клеток. Вход кальция в клетку через депо-управляемые кальциевые каналы — это процесс, при котором уменьшение концентрации кальция в эндоплазматическом ретикулуме активирует приток кальция через каналы в плазматической мембране. В последнее время были открыты основные молекулы, которые принимают участие в этом сигнальном пути. Белки STIM1 и STIM2 функционируют как кальциевые сенсоры: передают сигнал о снижении концентрации кальция в просвете эндоплазматического ретикулума, так называемом кальциевом депо, на каналы в плазматической мембране, состоящие, в том числе, и из белков Orai1-3, и активируют их.

Изменения в механизме транспорта кальция и поддержания его внутриклеточной концентрации были выявлены при многих патологических процессах. В частности, нарушения функционирования белка Orai3 обнаружены при различных видах рака (при раке груди, лейкемии и др.). Таким образом, поиск регуляторов активности каналов, образованных белком Orai3, является актуальной задачей современной науки. Полученные результаты могут быть использованы для исследовательских и фармакологических целей.

В данной работе был проведен скрининг 250 химических соединений, структурно похожих на 2-APB(2-aminoethoxydiphenylborate) — широко используемый блокатор депо-зависимого входа. Для скрининга использовались клеточные линии HEK293 со стабильной экспрессией экзогенных белков STIM2 и Orai3, а также STIM1 и Orai3. Изменения концентрации кальция в цитозоле регистрировались с помощью мембранопроницающих флуоресцентных зондов Fura-2AM и Fluo-4AM.

В результате проведения скрининга химических веществ были отобраны потенциальные ингибиторы депо-зависимого входа кальция. Два соединения показали наибольшее подавление депо-зависимого входа в клеточной линии с экспрессией экзогенных белков STIM2 и Orai3. Более того, одно из веществ не подавляло депо-зависимый вход в клеточной линии STIM1-Orai3,

что говорит о его селективном действии на кальциевый вход, опосредованный белками STIM2 и Orai3. В дополнение к скринингу было оценено быстрое действие полученных ингибиторов.

Работа поддержана грантом РФФИ (17-54-80006).

К.В. Данько¹, С.В. Орлов²

ЭНДОГЕННЫЙ АПОЛИПОПРОТЕИН A1 КАК МОДУЛЯТОР СЕКРЕЦИИ ЦИТОКИНОВ МАКРОФАГАМИ M1 И M2, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ ИЗ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

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

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

K.V. Danko¹, S.V. Orlov²

ENDOGENEOUS APOLIPOPROTEIN A1 AS A MODULATOR OF CYTOKINE SECRETION BY M1 AND M2 MACROPHAGES, DIFFERENTIATED FROM HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES

¹ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

danko_katerina@mail.ru

Атеросклероз — это хроническое воспалительное заболевание, связанное с накоплением холестерина в интиме кровеносных сосудов и образованием атеросклеротических бляшек [1]. Аполипопротеин A1 (Apo A1) является главным структурным белком липопротеинов высокой плотности и играет важную роль в обратном транспорте холестерина [2]. Ранее в нашей лаборатории было установлено, что Apo A1 экспрессируется в макрофагах и существует в виде мембран-связанного белка на поверхности клеток [3]. Также было обнаружено, что анафилатоксин C3a изменяет поляризацию макрофагов.

Цель научно-исследовательской работы — изучение влияния эндогенного Apo A1 на секрецию цитокинов макрофагами M1 и M2 в присутствии анафилатоксина C3a.

Работа была выполнена на первичной культуре моноцитов, выделенных из периферической крови человека. Активацию по классическому пути (M1 макрофаги) проводили путем добавления в среду интерферона гамма (IFN γ) и липополисахарида (LPS), по альтернативному (M2 макрофаги) — интерлейкина 4 (IL-4). C3a-макрофаги инкубировали в среде, содержащей C3a. Трансфекцию клеток осуществляли с использованием малой интерферирующей РНК против Apo A1. Анализ секретируемых цитокинов проводили в среде, в которой инкубировались макрофаги. Иммуноферментный анализ применяли для измерения концентрации цитокинов.

Установлено, что нокдаун Apo A1 в макрофагах приводит к изменению характерного паттерна секреции цитокинов IL-6, антагониста рецептора интерлейкина 1 (IL-1Ra), IL-10. Продукция IL-6, характерного для M1 клеток, уменьшалась покоящимися и M2 макрофагами, однако не изменялась M1 и C3a-макрофагами. Концентрация анти-воспалительного IL-1Ra снижалась только в M2 и C3a- макрофагах. IL-10 — маркер

M2 поляризации — секретировался слабее в покоящихся, M1 и M2 макрофагах.

Из вышесказанного следует, что эндогенный Apo A1 макрофагов оказывает модулирующее влияние на цитокиновый профиль макрофагов в зависимости от их поляризации.

Работа была выполнена в рамках гранта РФФИ № 17-15-01326.

Литература:

1. Hopkins P. Molecular biology of atherosclerosis. *Physiological Reviews* 2013, 93(3), 1317–1542.

Cuchel M., Rader D. Macrophage reverse cholesterol transport: Key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* 2006, 113(21), 2548–2555.

Mogilenko D. et al. Endogenous apolipoprotein A-I stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and modulates Toll-like receptor 4 signaling in human macrophages. *The FASEB Journal* 2012, 26, 2019–2030.

М.А. Добрынин¹, Н.М. Корчагина^{2,3}, А.Д. Пржибельский³, Д. Шафранская⁴, Н.И. Енукашвили^{1,5}

ТРАНСКРИПТЫ ТАНДЕМНО ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ДНК УЧАСТВУЮТ В ФОРМИРОВАНИИ БЕЗМЕМБРАННЫХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МИТОХОНДРИЯМИ СТРУКТУР В ПРЕОУЛЯТОРНЫХ ООЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

² Клиника репродукции человека АВА-ПЕТЕР, Санкт-Петербург

³ Центр алгоритмической биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

⁴ Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

⁵ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

M.A. Dobrynin¹, N.M. Korchagina^{2,3}, A.D. Prjibelski³, D. Shafranskaya⁴, N.I. Enuakashvily^{1,5}.

TRANSCRIPTS OF TANDEM REPEATING DNA ARE INVOLVED IN THE FORMATION OF MEMBRANELESS MITOCHONDRIA-ASSOCIATED STRUCTURES IN HUMAN PREOVULATORY OOCYTES

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Ava-Peter — Scandinavia ART Clinic, Saint-Petersburg, Russia

³ Center for Algorithmic Biotechnology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

⁴ Faculty of Biology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

⁵ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

dobrmaki555@mail.ru

Тандемно повторяющаяся ДНК (ТП ДНК) составляет примерно 10% генома человека. Семейство ТП ДНК включает в себя классические человеческие сателлиты 1, 2, 3 (HS1, HS2, HS3), которые лежат в основе перичентромерного района хромосом. Транскрипты

HS2,3 играют важную роль в эмбриогенезе млекопитающих. ТП РНК присутствуют в эмбрионах мышей до зиготической активации. Неизвестно, включаются ли транскрипты HS2,3 в формирование безмембранных структур в позднем оогенезе человека.

Цель работы — исследовать наличие транскриптов HS2,3 и их локализацию в преовуляторных ооцитах человека.

Преовуляторные (GV и MI) ооциты человека получали в стимулированных циклах доноров. Клетки на данных стадиях не хранятся в банке донорских ооцитов и были переданы для исследований. Информированное согласие доноров, а также разрешение этического комитета клиники получено. Распределение HS2,3, его транскриптов и хеликазы DDX5 в ядрах преовуляторных ооцитов человека исследовали с помощью методов ДНК-ДНК и ДНК-РНК FISH и иммуно-FISH, соответственно. Двойное иммуноокрашивание было использовано для изучения пространственной взаимосвязи хеликазы и рецептора транслоказы наружной митохондриальной мембраны (Tom 20). Присутствие транскриптов HS2,3 в транскриптоме проверяли с помощью методов биоинформатического анализа опубликованных транскриптомов здоровых доноров.

При переходе от стадии GV к MI в ооцитах обнаружена транскрипция HS2,3. ТП РНК локализована в виде гранул в цитоплазме. В конце GV и на MI стадии гранулы хеликазы колокализованы с транскриптами HS2,3 в непосредственной близости от сигнала к Tom20. Анализ опубликованных транскриптомов выявил несколько полиаденилированных транскриптов HS2,3, содержащий участки гомологии с использованным зондом. Все выявленные транскрипты принадлежали к семействам HS2,3 ТП ДНК. Один из транскриптов содержал последовательность, которую ранее идентифицировали в транскриптах раковых и эмбриональных клеток. Транскрипты сгруппированы в безмембранных структурах РНП, которые похожи на тельца Бальбиани, описанные на стадии оогонии у млекопитающих. До настоящего времени в ооцитах на поздних стадиях созревания подобных структур найдено не было.

Работа поддержана грантами РФФ 19-74-20102 и РФФИ мол_а 18-34-00279.

Х.Х. Епремян¹, Р.А. Зиновкин²

ДРОЖЖЕВАЯ МОДЕЛЬ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

² Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, Russia

К.К. Епремян¹, Р.А. Зиновкин²

HEPATOCELLULAR CARCINOMA YEAST MODEL

¹ The Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, Russia

7700077@mail.ru

Хроническая инфекция вирусом гепатита В (HBV) является фактором риска развития гепатоцеллюлярной

карциномы (HCC). Белок HBx, экспрессирующийся в инфицированных клетках, играет важнейшую роль в репликации HBV и в патогенезе HCC, не взаимодействуя напрямую с ядерной ДНК, но выступая в качестве регулятора транскрипции клеточных белков. HBx, при высоком уровне экспрессии, связывается с митохондриями и вызывает их дисфункцию, фрагментацию, кластеризацию и аномальное распределение в клетке. Хроническая инфекция вирусом гепатита при участии HBx сопровождается окислительным стрессом, который играет важную роль в канцерогенезе, однако механизмы его индукции не известны. Мы предположили, что HBx, вызывая дисфункцию митохондрий, индуцирует продукцию активных форм кислорода (АФК), что в итоге провоцирует опухолевую трансформацию инфицированных гепатоцитов. Для проверки этой гипотезы была создана и исследована модель гетерологической экспрессии HBx в дрожжах *Yarrowia lipolytica*. Эти дрожжи, облигатные аэробы, растущие с высокой скоростью на средах простого состава, имеющие многолетнюю историю использования в качестве продуцентов гетерологических белков, как нельзя лучше подходят для такого рода исследований. Такая относительно простая модель позволит выявить индуцируемые HBx изменения в клетке, абстрагируясь от влияния хронического воспаления, иммунного ответа клетки и других факторов.

Найдено, что HBx экспрессируется в виде множества мелких агрегатов на периферии дрожжевых клеток, где обычно локализованы митохондрии. Экспрессия HBx вызывала ингибирование дыхания и синтеза АТФ, повышение генерации АФК и сниженную устойчивость к действию прооксидантов, фрагментацию митохондрий, повышенный уровень окислительного стресса в клетках и высокий показатель клеточной смерти. Митохондриально-направленный антиоксидант SkQThy в низких концентрациях снижал уровень окислительного стресса и увеличивал выживаемость исследуемых мутантов. Полученные результаты свидетельствуют об адекватности созданной дрожжевой модели для изучения процессов, связанных с экспрессией HBx.

Исследования проводились при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты №№, 17-00-00124 и 19-34-90165).

А.В. Ерофеева^{1,2}, А.Д. Никотина¹,
Б.А. Маргулис¹, И.В. Гужова¹

КАРДЕНОЛИД CL-43 ОПОСРЕДУЕТ ПРОТЕАСОМНУЮ ДЕГРАДАЦИЮ HSF1 В КЛЕТКАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

¹ ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

А.В. Erofeeva^{1,2}, A.D. Nikotina¹,
B.A. Margulis¹, I.V. Guzhova¹

CARDENOLIDE CL-43 PROMOTES PROTEASOMAL DEGRADATION OF HSF1 IN COLORECTAL CANCER CELLS

¹ Institute of cytology, RAS, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

anastasija_erofeeva@mail.ru

HSF1- транскрипционный фактор, основной ролью которого является активация генов белков HSP70. Он участвует в реакции клетки на тепловой шок и другие воздействия, приводящие к нарушению протеостаза клетки. Повышение уровня транскрипции генов HSF1 способствует повышению выживаемости раковых клеток, и этот эффект возрастает с увеличением злокачественности. Ранее в нашей лаборатории было обнаружено вещество, карденолид CL-43— ингибитор активности HSF1. Мы показали его эффект в противораковой терапии, однако механизм его работы не был исследован [1]. Целью данной работы является исследование механизмов работы и регуляции HSF1 в раковых клетках, а также выяснение механизмов ингибирования активности данного белка. В ходе работы была использована линия клеток колоректальной аденокарциномы человека DLD1. С помощью вестерн-блоттинга мы показали, что уровень HSF1 повышался после 3 часов инкубации после теплового шока по сравнению с клетками после 30 мин инкубации и контрольными клетками, не подвергавшимися тепловому шоку, что говорит о синтезе данного белка *de novo* после теплового воздействия. Также мы показали, что количество HSF1 достигает максимального значения через 3 часа после инкубации с CL-43 после теплового шока и снижается через 6, тогда как в контрольных клетках уровень HSF1 через 6 часов остаётся на том же уровне. В связи с этим мы предположили, что CL-43 может опосредовать протеасомную деградацию HSF1. Чтобы это проверить, мы провели инкубацию клеток с CL-43 в сочетании с MG-132, который является ингибитором протеасом. Мы установили, что CL-43 в сочетании с MG-132 не приводит к снижению уровня HSF1, в отличие от воздействия CL-43 без MG-132. Тогда мы предположили, что CL-43 способен запускать биохимические каскады, приводящие к фосфорилированию HSF1 по ser303, что способствует последующей протеасомной деградации HSF1, а также CL-43 может приводить к снижению количества активной, фосфорилированной по ser326, формы HSF1. Чтобы проверить эту гипотезу, мы провели иммуноцитохимическое окрашивание клеток на HSF1, фосфорилированный по ser326 и ser303. Мы показали, что при воздействии CL-43 уровень фосфорилированной формы ser326 падает, тогда как ser303, наоборот, увеличивается. Согласно полученным данным, можно сделать вывод о том, что CL-43 вызывает уменьшение количества HSF1 в раковых клетках, способствуя его деградации посредством фосфорилирования по ser303, а также способствует снижению количества активной формы HSF1, фосфорилированной по ser326, что в итоге вызывает снижение уровня HSP70. Кроме того, мы установили, что HSF1 *de novo* синтезируется в клетке после воздействия теплового шока.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-74-20161 и грантом РФФИ 18-29-09101.

Литература:

1. Alina D. Nikotina, et al. Discovery and optimization of cardenolides inhibiting HSF1 activation in human colon HCT-116 cancer cells. *Oncotarget*. 2018 Jun 5; 9(43): 27268–27279.

Е.А. Жайворон^{1,2}, К.С. Новицкая¹,
Е.В. Ломерт¹, Д.Г. Тентлер¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОАНТИТЕЛ ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПОДАВЛЕНИЯ АСТН4

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

E.A. Zhaivoron^{1,2}, K.S. Novitskaya¹,
E.V. Lomert¹, D.G. Tentler¹

FUNCTIONAL SILENCING OF ACTN4 WITH NANOBODIES

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

liisa.spbu@gmail.com

Альфа-актинин 4 (ACTN4) относится к немышечному типу актининов и встречается во всех тканях организма. Как актин-связывающий белок он регулирует перестройки цитоскелета, участвует в формировании стресс-фибрилл, фокальных и плотных контактов. ACTN4 преимущественно локализуется в цитоплазме, но также может транслоцироваться в ядро. Высокая экспрессия ассоциируется со многими типами рака, при этом подавление ACTN4 ингибирует пролиферацию и миграцию соответствующих линий раковых клеток. Было показано, что ACTN4 влияет на активность транскрипционного фактора NF-κB. Наши данные указывают на то, что эффект ACTN4 на активность раковых клеток может частично быть результатом влияния на NF-κB-зависимую транскрипцию генов.

Мы планируем исследовать эффекты супрессии ACTN4 на клетки немелкоклеточного рака легкого. С этой целью мы собираемся осуществить его функциональное подавление при помощи наноантител. Последовательность наноантител к спектриновому домену ACTN4 была предоставлена проф. Геттермансом (Department of Biomolecular Medicine, Ghent University). Наноантитела представляют собой антиген-связывающие домены антител из тяжелых цепей семейства верблюдовых, имеющие вес 12–15 кДа. Их чаще всего получают методом фагового дисплея из мРНК лимфоцитов периферической крови иммунизированного животного. Преимуществом наноантител является то, что они стабильны, имеют небольшой размер и могут продуцироваться непосредственно в исследуемых клетках.

Клетки линий H1299 и H1299/RelA (линия со стабильной активацией RelA-субъединицы NF-κB) будут трансфицированы плазмидой, кодирующей наноантитела к спектриновым доменам ACTN4 (nbACTN4). Мы рассчитываем, что это приведет к нарушению димеризации и связывания ACTN4 с другими белками. Важным является то, что ген наноантител экспрессируется внутри самих клеток, что позволяет контролировать внутриклеточную локализацию путем внесения соответствующих сигнальных последовательностей.

Мы сконструировали экспрессионные плазмиды, кодирующие наноантитела к ACTN4 с FLAG- и 6xHIS-тегами для последующей визуализации и геном устойчивости к пуромицину. Мы получили постоянные линии H1299 и H1299/RelA, экспрессирующие nbACTN4-FLAG. Далее планируется оценить внутриклеточную локализацию наноантител и их колокализацию с ACTN4 с помощью иммунофлуоресценции, а также коиммунопреципитации. После этого мы исследуем

влияние pACTN4 на экспрессию NF-κB-зависимых генов. Для выявления физиологических эффектов функционального подавления ACTN4 будут проведены тесты на скорость пролиферации и миграции. На следующем этапе мы планируем внести в последовательность нано-антител NLS и NES для изучения результатов супрессии ACTN4 отдельно в ядре и цитоплазме.

Работа выполняется при поддержке гранта РФФ № 14.WO3.31.0029.

О.Г. Запарина¹, А.В. Ковнер¹

АНТИОКСИДАНТЫ РАЗНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ СНИЖАЮТ НЕОПЛАЗИЮ ЭПИТЕЛИЯ ЖЕЛЧНЫХ ПРОТОКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОПИСТОРХОЗЕ

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

O.G. Zaparina¹, A.V. Kovner¹

VARIOUS ANTIOXIDANT REDUCES THE BILIARY NEOPLASIA IN EXPERIMENTAL OPISTHORCHIASIS

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

zp.oksana.93@gmail.com

Описторхоз, вызванный паразитированием кошачьей двуустки *Opisthorchis felineus* в гепатобилиарной системе рыбоядных млекопитающих и человека, широко распространен на территории Западной Сибири. Это заболевание сопровождается структурно-функциональными нарушениями в печени, включая воспаление, перидуктальный фиброз, а также преанцереогенными изменениями эпителия желчных протоков.

Существует гипотеза, что паразит-специфические оксистеролы, содержащиеся в экскреторно-секреторном продукте гельминтов, способны вызывать в клетках эпителия окислительные повреждения в ДНК, приводящие к мутациям в процессе ее репликации. В результате накопления мутаций возникают преанцереогенные изменения, например, неоплазия, способные привести к злокачественной трансформации.

Для изучения возможной роли окислительного стресса при описторхозе, мы оценили накопление окислительных повреждений у хомячков через 1–18 месяцев после заражения и влияние антиоксидантов разного механизма действия (природного антиоксиданта ресвератрола и митохондриально-направленного антиоксиданта SKQ1 [10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium]) на состояние гепатобилиарной системы хомячков через 1 и 3 месяца инфекции.

С помощью иммуногистохимического и иммуноферментного анализов было оценено накопление маркеров перекисного окисления липидов (ПОЛ) (малоновый диальдегид и 4-гидроксиноненаль), окислительных повреждений ДНК (8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина) и маркеров воспаления в печени в зависимости от срока инфекции.

У животных, получавших антиоксиданты, накопление маркеров ПОЛ в печени было значительно снижено, что свидетельствует об уменьшении степени проявления окислительного стресса в тканях. С помощью полуколичественного анализа гистологических препаратов и биохимии сыворотки крови, было выявлено положительное влияние антиоксидантов

на структурные-функциональное состояние печени. С помощью метода ПЦР в реальном времени были оценены уровни мРНК генов ферментов, участвующих в развитии воспалительного ответа и фиброгенеза, которые снижались под действием антиоксидантов.

Таким образом, активные формы кислорода играют значимую роль в развитии неоплазии холангиоцитов при описторхозе. Антиоксиданты, вне зависимости от механизма их действия, оказывают благоприятное влияние на состояние печени за счет снижения воспаления и степени неоплазии холангиоцитов.

Работа выполнена в рамках РФФИ (19-34-90060).

М.В. Зорин, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис, В.Ф. Лазарев

РОЛЬ БЕЛКА ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В РАЗВИТИИ ВТОРИЧНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

M.V. Zorin, I.V. Guzhova, B.A. Margulis, V.F. Lazarev THE ROLE OF GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN SECONDARY DAMAGE AFTER TRAUMATIC BRAIN INJURY

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

kram.98@mail.ru

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) — один из мажорных белков клетки, фермент, задействованный в 6-ой стадии гликолиза. Помимо участия в гликолизе ГАФД может выступать в роли транскрипционного фактора, сенсора окислительного стресса, способна влиять на везикулярный транспорт, индуцировать апоптоз и многое другое. При повреждении клеток внутриклеточные белки могут оказываться в межклеточном пространстве. Ранее на примере болезни Хантингтона мы показали, что внеклеточная ГАФД способна вызывать апоптоз в соседних неповреждённых клетках. Таким образом, появление экзогенной ГАФД в межклеточном пространстве может ускорять процесс нейродегенерации. При черепно-мозговой травме гликолитический фермент в спинномозговой жидкости является одним из факторов вторичных повреждений мозга, развивающихся в течение длительного времени после травмы. В настоящий момент терапия посттравматического состояния сводится к минимизации последствий первичных повреждений. При этом негативное влияние вторичных повреждений может сказываться на здоровье пациента через месяцы после травмы. Реабилитационная терапия, направленная на купирование вторичных повреждений, могла бы существенно улучшить качество жизни пациентов. Целью данной работы является изучение механизмов влияния экзогенной ГАФД на индукцию апоптоза клетки.

В ходе работы в среду для культивирования клеточной линии нейробластомы человека SH-SY-5Y мы вносили экзогенную ГАФД в конечной концентрации 25 мкг/мл. Нами была прослежена динамика проникновения белка в клетку и образования в ней цитотоксических агрегатов как в цитоплазме, так и в ядре. Мы показали, что экзогенная ГАФД при входе в цитоплазму способна связываться с белком SIAH1, транспортируя его в ядро. SIAH1 — убиквитин-лигаза, транскрипционный фактор, участвующий в апоптозе клетки. Нами было показано,

что после внесения экзогенной ГАФД в среду наблюдается повышение уровня экспрессии проапоптотических генов BAX, p21 и PUMA.

В результате, мы показали возможные механизмы индукции апоптоза экзогенной ГАФД. Эти пути могут стать мишенью в ходе терапии вторичных поврежденных клеток головного мозга. Выявление и изучение новых механизмов цитотоксического влияния экзогенной ГАФД в перспективе может повысить эффективность реабилитационной терапии последствий черепно-мозговой травмы и нейродегенеративных заболеваний.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 20-315-70049.

Л.Ш. Измайлова, А.В. Косых,
Е.А. Воротеляк, А.В. Васильев

МОДЕЛИРОВАНИЕ ИМПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНОВ МЫШИ

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

L. Sh. Izmaylova, A.V. Kosykh,
E.A. Vorotelyak, A.V. Vasil'ev

NEW MODEL FOR STUDY OF MOUSE EMBRYO IMPLANTATION

Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

luba.ranaway-94@yandex.ru

Процесс имплантации представляет собой прикрепление эмбриона к стенке матки материнского организма. Дальше развиваются только прикрепившиеся эмбрионы. После установления первичного контакта с люминальным эпителием эмбрион внедряется в стенку матки. В это время эмбрион активно взаимодействует с клетками эндометрия. Не все эмбрионы успешно имплантируются. Неудачное прохождение имплантации — это причина, большинства спонтанных абортос у человека. Для изучения имплантации и нарушений ее при патологии, важно приближенное к условиям *in vivo* моделирование имплантации. На данный момент развитие эмбриона мыши *in vitro* от стадии бластоцисты до имплантации и формирования зародышевого цилиндра было показано с использованием различных субстратов для прикрепления, но ни один из них не включал клетки эндометрия мыши.

Цель этой работы — создание новой модели имплантации эмбриона мыши *in vitro* на субстрат на основе коллагенового геля и первичных культур клеток эпителия и стромы эндометрия мыши. Такая модель позволит изучать взаимодействие эмбриона и клеток эндометрия, что определяет имплантацию эмбриона *in vivo*, и влияние клеток эндометрия на развитие прикрепленного эмбриона.

На подготовительной стадии работы был сконструирован модельный субстрат на основе коллагенового геля и первичных культур клеток эпителия и стромы эндометрия мыши. Потом мы показали прикрепление бластоцисты мыши к модельному субстрату и развитие эмбриона до стадии зародышевого цилиндра. Зародышевый цилиндр был охарактеризован морфологически и по локализации экспрессии маркеров, специфичных для эпибласта, экстраэмбриональной эктодермы и примитивной энтодермы: Oct4, Eomes. Также мы разработали протоколы выделения чистых культур люминального эпителия и стромы матки мыши.

Таким образом, была создана новая модель для изучения развития эмбрионов мыши в околоимплантационные сроки. Модель можно использовать для изучения влияния на имплантацию химических, физических и биологических факторов, взаимодействия эмбриона с клетками эндометрия и патологических изменений эмбриона или клеток эндометрия, которые препятствуют имплантации.

Работа была выполнена в рамках Госзадания ИБР РАН.

А.С. Ильницкая¹, И.Ю. Житняк¹,
А. Готро², Н.А. Глушанкова¹

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ SASH1 В НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва, Россия
² Ecole Polytechnique/CNRS, Франция

A.S. Ilnitskaya¹, I.Yu. Zhitnyak¹,
A. Gotro², N.A. Glushankova¹

IMMUNOFLUORESCENT RESEARCH OF THE INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF SASH1 IN NORMAL AND TRANSFORMED EPITHELIAL CELLS

¹ N.N. Blokhin National Medical Research Center,
Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia
² Ecole Polytechnique/CNRS, France

ilnitskaya.alla@gmail.com

SASH1 является белком, содержащим домены SAM и домен SH3, которые преимущественно обнаруживаются в сигнальных и адаптерных молекулах. Для некоторых типов опухолей SASH1 рассматривается в качестве опухолевого супрессора: в карциномах молочной железы и толстой кишки обнаружено выраженное снижение экспрессии SASH1 по сравнению с нормальной тканью. С использованием конфокальной микроскопии нами было проведено иммунофлюоресцентное исследование распределения SASH1 в культурах нормальных эпителиоцитов IAR-2 и IAR-20, трансформированных *in vitro* эпителиальных клеток линии IAR-6-1, а также эпителиоцитов линии рака толстой кишки HT-29. Нормальные (IAR-20 и IAR-2) и опухолевые (HT-29) эпителиальные клетки образовывали стабильные линейные межклеточные адгезионные контакты (АК), которые были ассоциированы с кольцевыми актиновыми пучками. В этих клетках SASH1 локализовался с кольцевыми пучками и линейными АК, в то время как в ламеллиподиях SASH1 не детектировался, в отличие от кортактина. Под воздействием EGF клетки IAR-20 и HT-29 проходили эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), который в культурах HT-29 и IAR-20 имел существенные различия. Так, при прохождении ЭМП, клетки IAR-20 утрачивали стабильную межклеточную адгезию, но сохраняли аккумуляцию E-кадгерина в нестабильных радиальных АК, ассоциированных с прямыми актиновыми пучками. В таких контактах аккумуляровался как SASH1, так и кортактин. В ламеллиподиях, как на активном крае мигрирующих клеток, так и в зонах межклеточного взаимодействия, SASH1, в отличие от кортактина,

не детектировался. SASH1 также присутствовал в радиальных E-кадхериновых АК трансформированных эпителиоцитов IAR-6-1. При прохождении ЭМП клетками HT-29, происходило полное разрушение АК и эндцитоз E-кадгерина, что приводило к утрате стабильной межклеточной адгезии. Мы наблюдали исчезновение SASH1 из зон межклеточного взаимодействия. Таким образом, SASH1 ассоциирован с актиновыми пучками нормальных и трансформированных эпителиоцитов, в том числе с актиновыми пучками АК. Значение SASH1 для структур межклеточной адгезии нормальных и опухолевых клеток требует дальнейшего изучения.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-54-16005.

Р.А. Кадырова¹, Н.А. Барлев², Д.Г. Тентлер², В.З. Кривицкая¹, А.В. Слита³, В.В. Зарубаев³

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ ВИРУСА ГРИППА А В УСЛОВИЯХ ИНГИБИРОВАНИЯ SET7/9 IN VITRO

¹ ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУН Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН) Санкт-Петербург, Россия

³ ФБУН Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (ФБУН Ниизм имени Пастера) Санкт-Петербург, Россия

R.A. Kadyrova¹, N.A. Barlev², D.G. Tentler², V.Z. Krivitskaya¹, A.V. Slita³, V.V. ZarubaeV³

THE EFFECT OF SET7/9 INHIBITION IN VITRO ON THE LEVEL OF EXPRESSION OF INFLUENZA A VIRUS PROTEINS

¹ Smorodintsev research institute of influenza Ministry of Healthcare of the Russian Federation (NII Grippe), Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

³ Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Saint-Petersburg Pasteur Institute), Saint-Petersburg, Russia

Renakad87@mail.ru

Транскрипционный фактор NF-κB играет ведущую роль в формировании врожденного иммунного ответа, в частности, при инфекции вируса гриппа. При его участии ценой гибели инфицированных клеток ограничивается репродукция вируса. С другой стороны, активация NF-κB выгодна вирусу и необходима для продукции вирусного потомства.

Поскольку одним из этапов активации NF-κB является метилирование RelA/p65 лизинметилтрансферазой SET7/9 (ЛМТ), мы считаем, что ЛМТ может влиять на экспрессию вирусных белков.

Мы оценивали уровни экспрессии нуклеопротеина (NP) и гемагглютинаина (HA) вируса гриппа в различных клеточных линиях карциномы легкого человека.

Работа проводилась *in vitro* в культурах клеток A549 и H-1299, интактных и трансфецированных плазмидой pRc/CMV-RELA для получения сверхэкспрессии p65. Клетки инфицировали штаммами вируса гриппа A: A/PuertoRico/8/34(H1N1) и A/Kurgan/5/05 (H5N2).

К клеткам A549 добавляли синтетический ингибитор Set7/9 (R) –PFI-2, после чего их заражали вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в дозах 1 – 10⁶ TCID₅₀. Клетки H-1299, интактные и с повышенной экспрессией p65, заражали вирусом гриппа A/Kurgan/5/05. Через 72 часа оценивали в них содержание гемагглютинаина (HA) нуклеопротеина (NP) при помощи метода микркультурального ИФА (м-ИФА).

Результаты. Мы наблюдали снижение продукции белка NP на один порядок при инфицировании клеток H-1299/ pRc/CMV-RELA. HA в этих же клетках накапливалось на 2 порядка больше, чем в интактной культуре H-1299.

Ингибирование SET7/9 приводило к повышению продукции NP в 2–5 раз в клетках A549, инфицированных дозами вируса 1, 10 и 100 TCID₅₀, по сравнению с контролем. При заражении другими инфекционными дозами вируса гриппа подобный эффект не наблюдался. Продукция гемагглютинаина при заражении клеток инфекционными дозами вируса гриппа 1-10 TCID₅₀, напротив, снижалась при ингибировании SET7/9 по сравнению с контролем в 1,7–5 раз. Однако в клетках, инфицированных более высокими дозами вируса, экспрессия HA повышалась и в контрольных, и в обработанных ингибитором (R)-PFI-2 клетках.

Обсуждение: Поскольку мы наблюдаем схожую репродукцию белка NP вируса гриппа в интактных клетках H-1299 и клетках A549 с ингибитором SET7/9, то можно предположить, что они непосредственно взаимодействуют между собой при вирусной инфекции. Поскольку субъединица p65 является непосредственной участницей действия NF-κB фактора, то схожесть полученных данных может указывать на влияние ЛМТ SET7/9 на активацию NF-κB при гриппозной инфекции.

Я.К. Капушак, Р.А. Тумашев

МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ХОМЯЧКОВ M. AURATUS В ДИНАМИКЕ ХРОНИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПИСТОРХОЗА

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Y.K. Kapushchak, R.A. Tumashev

MECHANISMS OF TIME-DEPENDENT KIDNEY FAILURE DEVELOPMENT IN CHRONIC OPISTHORCHIASIS ON M. AURATUS HAMSTER MODEL

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

YarikKaps@yandex.ru

Описторхоз, обусловленный инфекцией трематоды *Opisthorchis felinus*, один из наиболее распространенных гельминтозов человека в РФ. Описторхи паразитируют в желчевыводящих путях и вызывают дисфункцию печени. Заболевание характеризуется длительным течением и приводит к холангиостазу, хроническому воспалению, холангио и перидуктальному фиброзу печени. Как длительно текущее заболевание, описторхоз оказывает системное воздействие на организм, однако его участие в развитии почечной патологии не изучено.

Целью работы было структурно-функциональное исследование почек хомячка при хроническом

экспериментальном описторхозе. Были исследованы гистологические изменения почек и уровни биохимических маркеров почечной патологии у сирийского хомячка, зараженного метацеркариями *O. felineus* в динамике хронического описторхоза от 1 до 18 месяцев.

Уровень белка в моче был повышен начиная с 1-го месяца инфекции в 15–30 раз по сравнению с неинфицированными животными. Увеличение креатинина в сыворотке крови (в 1.37–3 раз) отмечали, начиная с 6-го месяца инфекции. Поскольку данные показатели указывают на развитие почечной недостаточности, исследовали изменения структуры ткани почек с помощью полуквантитативного анализа гистологических срезов, окрашенных гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону. Зависимость от времени была проанализирована с помощью метода линейной регрессии.

Начиная с первого месяца инфекции, на гистологических срезах почек наблюдали расширение пространства капсулы Шумлянского-Боумана, наличие цилиндров в просвете канальцев коркового и мозгового слоев почки, при этом увеличение количества цилиндров согласно данным линейной регрессии коррелировало со сроком заболевания. Через 13 и 18 месяцев инфекции наблюдали выраженный гломерулофиброз, затрагивавший до 95% всех клубочков. Для оценки механизмов развития почечной недостаточности была исследована концентрация маркера почечной патологии KIM-1, а также проведено иммуногистохимическое окрашивание срезов почек на маркер окислительного повреждения липидов (4-гидроксиноненаль), маркеры воспалительной инфильтрации CD68, а также на суммарный антиген *O. felineus*.

Таким образом, впервые показано, что хронический описторхоз приводит к развитию почечной недостаточности, усиливающийся от времени инфекции.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-15-00098.

**А.И. Качалова¹, Д.М. Поташникова¹,
А.А. Саидова¹, И.А. Воробьев^{1,2}**

**ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ
И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ
МОДЕЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ РАКА
ПРОСТАТЫ PC3 И 22RV1**

¹ Биологический факультет МГУ
им. М.В. Ломоносова, кафедра клеточной биологии
и гистологии, Москва, Россия

² НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**A.I. Kachalova¹, D.M. Potashnikova¹,
A.A. Saidova¹, I.A. Vorobjev^{1,2}**

**IMMUNOPHENOTYPIC AND FUNCTIONAL
FEATURES OF PROSTATE CANCER MODEL
CELL LINES PC3 AND 22RV1**

¹ School of Biology, Dept. of Cell Biology and Histology,
M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow,
Russia

² A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow,
Russia

Nastya.Kachalova@gmail.com

Рак простаты является первым по встречаемости злокачественным новообразованием у мужчин и второй по распространенности причиной смерти мужчин

во всем мире. В настоящее время выделено несколько типов опухолей простаты, отличающихся по своему происхождению, морфологии и клиническим проявлениям. Существуют модельные системы для изучения рака простаты — постоянные клеточные линии, полученные из разных очагов метастазирования опухолей. В нашей работе в качестве модельных объектов были выбраны две клеточные линии — PC3 и 22Rv1, — различающиеся по происхождению и уровню экспрессии андрогенового рецептора. Задачей данной работы стало выявление иммунофенотипических особенностей этих клеточных линий, которые, возможно, соответствуют различным типам опухолей предстательной железы. Мы оценили митотический индекс (МИ), экспрессию маркера пролиферации Ki-67 и накопление в фазе G2/M клеточного цикла в ответ на классические митостатики у этих клеточных линий, а затем сравнили их иммунофенотипы. В результате получили разную скорость пролиферации клеток PC3 и 22Rv1: МИ составил 3,8% для PC3 и 0,5% для 22Rv1. Процент клеток, положительных по Ki-67 был оценен с помощью проточной цитометрии и составил 93,1% для PC3 и 12,6% для 22Rv1. На исследованных линиях был протестирован протокол анализа клеточного цикла и апоптоза, применимый для моделирования влияния различных веществ на эти процессы. Анализ накопления клеток в фазе G2/M в ответ на паклитаксел и нокодазол выявил разные пороговые митостатические концентрации: для PC3 она составила 30 нМ (паклитаксел) и 300 нМ (нокодазол), в то время как для 22Rv1 10 нМ (паклитаксел) и 100 нМ (нокодазол). Клетки PC3 имели иммунофенотип: CD54+/CD29+/CD44+/CD38+/CD166+/CD24+/CD205+/CD146+/-/CD90-/CD57-/CD133-/CD10-/CD13-/CD16-. Клетки 22Rv1 имели иммунофенотип: CD54+/CD29+/CD44+/CD38+/CD166+/CD24+/CD205+/CD146+/-/CD90-/CD57-/CD133-/CD10-/CD13-/CD16-. Основные различия заключались в уровне экспрессии молекул адгезии (CD54, CD29, CD44). Таким образом, для моделей агрессивного и индолентного рака простаты были выявлены различия в уровне пролиферации, пороговой чувствительности к митостатикам и поверхностном иммунофенотипе.

Работа была поддержана грантом РФФИ #17-54-33009.

А.В. Ковалева¹, Е.С. Соломатина¹, А.В. Творогова²,
А.А. Саидова¹, И.А. Воробьев^{1,2}

МОРФОЛОГИЯ ФОКАЛЬНЫХ КОНТАКТОВ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ КИНАЗ ROCK И MLCK

¹ Кафедра клеточной биологии и гистологии,
биологический факультет, Московский
государственный университет имени
М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

A.V. Kovaleva¹, E.S. Solomatina¹, A.V. Tvorogova²,
A.A. Saidova¹, I.A. Vorobjev^{1,2}

FOCAL ADHESION MORPHOLOGY AT INHIBITION OF ROCK AND MLCK KINASES

¹ Cell biology and histology department, School
of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,
Moscow, Russia

² A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow,
Russia

a.kovaleva2018@gmail.com

Фокальные контакты (ФК) обеспечивают физическую связь между актиновыми микрофиламентами и внеклеточным матриксом и, как следствие, способность клеток к миграции. ФК образуются в ответ на акто-миозиновое сокращение. Фосфорилирование миозина и дальнейшую контрактильность обеспечивают киназы ROCK и MLCK.

В работе были проанализированы площадь и средняя интенсивность флуоресценции (СИФ) ФК в норме и при подавлении миозин II-фосфорилирующих киназ ROCK и MLCK (10 мкМ Y27632 и 10 мкМ ML-7). Фибробласты 3T3 и клетки остеосаркомы человека U2OS с постоянной экспрессией структурного белка ФК винкулина, конъюгированного с RFP снимали в режиме цейтраферной съемки с интервалом 5 минут в течение 8 ч. Данные представлены в виде медианы и разброса, статистически достоверные отличия по критерию Манна-Уитни ($p < 0.05$).

В клетках культуры 3T3 площадь фокальных контактов до воздействия Y27632 составляет 0.85 мкм² (0.08–5.45, $n=93$), после воздействия — уменьшается в 2.4 раза до 0.35 мкм² (0.14–0.77, $n=48$). В присутствии ML-7 площадь ФК уменьшается в 2 раза с 0.9 мкм² (0.13–8.34, $n=118$) до 0.45 мкм² (0.09–1.68, $n=100$).

СИФ до воздействия Y27632 — 2636 усл.ед.фл. (577.2–6259, $n=93$), при ингибировании киназы ROCK уменьшается до 2073 усл.ед.фл. (1034–3362, $n=48$). В присутствии ML-7 СИФ не изменяется.

В клетках остеосаркомы человека U2OS площадь фокальных контактов до воздействия Y27632 составляет 1.1 мкм² (0.2–9.06, $n=231$), после воздействия — уменьшается в 2.4 раза до 0.45 мкм² (0.13–1.21, $n=59$). При подавлении активности киназы ML-7 площадь ФК уменьшается с 0.96 мкм² (0.16–8.48, $n=323$) до 0.75 мкм² (0.2–4.06, $n=313$).

СИФ до воздействия Y27632 — 3085 усл.ед.фл. (103.7–10751, $n=231$), при ингибировании киназы ROCK уменьшается до 1565 усл.ед.фл. (3.24–4261, $n=49$). В присутствии ML-7 СИФ не изменяется.

Таким образом ингибирование киназы ROCK приводит к разборке ФК и диссоциации винкулина из зоны ФК как нормальных, так и в опухолевых клетках. При подавлении активности киназы MLCK площадь

ФК уменьшается при сохранении общего количества белка в ФК в обеих клеточных линиях.

И.В. Ковалева¹, Л.В. Спирина^{1,2}

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА, ЭСТРОГЕНОВ И АНДРОГЕНОВ ПРИ РАКЕ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ ГИПЕРПЛАЗИИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СВЯЗЬ С РОСТОВЫМИ И ТРАНСКРИПЦИОННЫМИ ФАКТОРАМИ

¹ Сибирский государственный медицинский
университет, Томск, Россия

² НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, Томск,
Россия

I.V. Kovaleva¹, L.V. Spirina^{1,2}

ANDROGENS, ESTROGENS AND PROGESTERONE IN PROSTATE CANCER AND BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA, RELATION WITH GROWTH AND TRANSCRIPTION FACTORS

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

² Cancer Research Institute, Tomsk NMRC of the RAS,
Tomsk, Russia

irina.kovalyova.kovaleva@mail.ru

Актуальность. Рак предстательной железы (РПЖ) по-прежнему остаётся наиболее распространённым видом рака среди мужского населения [1]. Андрогеновый рецептор (AR) и его лиганды играют ключевую роль в гормональном канцерогенезе предстательной железы (ПЖ) [2]. Оба подтипа рецептора эстрогенов: ER α и ER β широко представлены в тканях ПЖ, повышенная экспрессия ER α и регулируемых им генов может указывать на способность гормон-рефрактерных опухолей ПЖ обходить андроген-зависимый путь с использованием эстрогенов и прогестина для собственного роста. Имеются данные о вовлечённости рецептора прогестерона (PR) в прогрессию РПЖ, однако его роль остаётся малоизученной [3].

Цель. Изучение экспрессии AR, PR, ER, транскрипционных факторов NF- κ B p65 и p50, HIF-1 α , HIF-2 α , ростовых факторов VEGF, CAIX, VEGFR в ткани больных РПЖ и пациентов с доброкачественной гиперплазией.

Материалы и методы. В исследование включены 97 пациентов, получавших лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ. Группа пациентов с РПЖ представлена 55 мужчинами, 42 пациента имели доброкачественную гиперплазию предстательной железы (ДГПЖ). В исследовании использовались образцы гиперплазированной и опухолевой ткани, полученные при проведении диагностической биопсии. Экспрессию рецепторов и факторов определяли с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Выводы. В исследовании зафиксирована повышенная экспрессия транскрипционных факторов HIF и NF- κ B при пониженной экспрессии PR в ткани РПЖ, что подтверждает данные о его онкосупрессивной роли [3]. Отмечена значимость PR в развитии патологии простаты при низких значениях экспрессии mPINK AR. **Заключение.** Полученные данные указывают на значимость ассоциации PR/AR в развитии опухолевой патологии ПЖ.

Литература:

- Schatten H. Brief Overview of Prostate Cancer Statistics, Grading, Diagnosis and Treatment Strategies. Adv Exp Med Biol. 2018; 1095:1–14.

- Feng Q., HeB. Androgen Receptor Signaling in the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol.* 2019; 9: 858.
- Chen R., Yu Y., Dong X. Progesterone receptor in the prostate: A potential suppressor for benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017; 166: 91–96.

**А.А. Коваленко, М.В. Захарова, А.П. Шварц,
О.Е. Зубарева, А.В. Зайцев**

**АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНОВ ГЛУТАМАТНЫХ МЕТАБОТРОПНЫХ
РЕЦЕПТОРОВ В МОЗГЕ КРЫС В ЛИТИЙ-
ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ
И МОДЕЛИ ФЕБРИЛЬНЫХ СУДОРОГ**

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

A.A. Kovalenko, M.V. Zakharova,
A.P. Schwarz, O.E. Zubareva, A.V. Zaitsev

**ANALYSIS OF CHANGES IN GLUTAMATE
METABOTROPIC RECEPTOR GENES
EXPRESSION IN THE RAT BRAIN AFTER
LITHIUM-PILOCARPINE-INDUCED AND FEBRILE
SEIZURES**

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and
Biochemistry Russian Academy of Sciences, Saint-
Petersburg, Russia*

kovalenko_0911@mail.ru

Височная эпилепсия (ВЭ) — одна из самых тяжелых, трудно поддающихся лечению форм эпилепсии. Клинические наблюдения показывают, что 30–50% пациентов с ВЭ в детском возрасте перенесли фебрильные судороги. Нарушение баланса между тормозными и возбуждающими системами в различных отделах мозга считается основным патогенетическим механизмом ВЭ. Метаботропные рецепторы глутамата, являющиеся модуляторами работы глутаматергического синапса, рассматриваются как перспективная мишень для поиска новых способов лечения ВЭ. Целью работы являлся анализ изменений экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата I и II групп в вентральной и дорзальной областях гиппокампа крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии и модели фебрильных судорог.

Для индукции литий-пилокарпиновых судорог крысам самцам линии Wistar в возрасте 7–8 недель вводили р-р LiCl и затем через 24 часа пилокарпин (ПК). Контрольной группе крыс вводили физ. р-р и LiCl. Выделение образцов мозга проводили в латентную фазу (на 3 и 7 сутки после судорог) и в хроническую фазу модели (на 60 сутки). Фебрильные судороги индуцировали нагреванием 11-дневных крысят теплым воздухом до повышения их ректальной температуры до 42–43 °С. В качестве контроля использовали крысят, которых на аналогичное время изолировали от матери и интактных крысят. Выделение образцов мозга осуществляли в возрасте 14 и 21 дня жизни. Исследование изменений экспрессии генов метаботропных рецепторов I группы (*Grm1* и *5*), опосредующих усиление эксайтотоксичности, и II группы (*Grm3*), опосредующими ее подавление, выполнено методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

В литий-пилокарпиновой модели изменения экспрессии генов рецепторов I группы выявлены только в латентную фазу: продукция мРНК *Grm1* была снижена на 3 сутки после судорог в дорзальном гиппокампе

и на 7 сутки в вентральном гиппокампе, экспрессия гена *Grm5*, напротив, увеличивалась в обеих областях гиппокампа на 3 сутки. Продукция мРНК *Grm3* (II группа) менялась и в латентную фазу (увеличение экспрессии), и в хроническую (снижение экспрессии).

После фебрильных судорог наиболее выраженные изменения экспрессии метаботропных рецепторов глутамата отмечались на 14 сутки жизни. Выявлено снижение экспрессии генов *Grm1* и *Grm5* в дорзальном гиппокампе и усиление экспрессии гена *Grm3* в вентральном гиппокампе.

Таким образом, обнаружены сходные изменения экспрессии генов метаботропных рецепторов I и II групп после литий-пилокарпиновых и фебрильных судорог.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-15-10202.

**Д.О. Колесников, А.Ю. Скопин, Л.Н. Глушанкова,
С.В. Созонова, Е.В. Казначеева, А.В. Шалыгин.**

**РОЛЬ БЕЛКОВ ORAI И STIM В РЕГУЛЯЦИИ
ЭНДОГЕННЫХ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫХ
КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ TRPC1 В КЛЕТКАХ
HEK293**

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

D.O. Kolesnikov, A.Yu. Skopin, L.N. Glushankova,
S.V. Sozonova, E.V. Kaznacheeva, A.V. Shalygin.

**ROLE OF ORAI AND STIM PROTEINS
IN REGULATION OF ENDOGENIC CALCIUM
STORE-OPERATED TRPC1 CHANNELS
IN HEK293 CELLS**

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

koledmi3@mail.ru

Кальций опосредует множество внутриклеточных процессов. Депо-управляемый кальциевый вход — важный источник поступления кальция в цитоплазму клетки.

Основными участниками этого процесса являются сенсоры кальция — STIM1 и STIM2, а также депо-управляемые каналы Orai и TRPC.

Известно, что при опустошении депо каналы Orai напрямую активируются сенсорами STIM. Сведения об участии каналов TRPC в системе депо-управляемого входа на настоящий момент противоречивы.

Исследование посвящено взаимодействию между белками STIM и Orai с эндогенными каналами TRPC1 и их роли в активации каналов TRPC1 в ответ на опустошение депо кальция.

Мы изучали на клетках HEK293 как отсутствие функционально активных белков Orai влияет на свойства эндогенных депо-управляемых каналов TRPC1. Для этого мы использовали следующие экспериментальные подходы: оверэкспрессия доминантно-негативных мутантов белков Orai, а также нокаунт и нокаут по генам *Orai1* и *Orai3* при помощи мРНК и системы CRISPR-Cas9.

Мы выяснили, что отсутствие функционально-активных белков Orai не убирает активность эндогенных каналов TRPC1, однако отменяет их чувствительность в ответ на опустошение депо кальция.

Меняя концентрацию внеклеточного кальция и регистрируя активность эндогенных каналов TRPC1 в проводящих растворах бария и натрия, мы показали, что в физиологических условиях кальций необходим для активации каналов TRPC1 в ответ на опустошение депо.

Также мы изучили влияние кальциевых сенсоров STIM на свойства эндогенных каналов TRPC1. Изменение уровня

экспрессии сенсоров STIM не влияло на селективность эндогенных каналов TRPC1. В то же время оверэкспрессия кальциевого сенсора STIM2 восстанавливала чувствительность к уровню кальция в депо эндогенных каналов TRPC1 даже при полном отсутствии внеклеточного кальция.

Наши данные позволяют предполагать, что вход кальция через каналы Orai необходим для встраивания эндогенных депо-управляемых каналов TRPC1 в плазматическую мембрану, где они могут быть активированы кальциевыми сенсорами STIM. Оверэкспрессия сенсора STIM2 повышает базальный вход кальция в цитоплазму, таким образом, увеличивая число встроившихся в мембрану эндогенных каналов TRPC1.

Исследование было поддержано грантом РФФИ № 19-315-90065 (А.В. Шалыгин, Д.О. Колесников) и грантом РФФИ № 19-14-00114 (А.Ю. Скопин, Л.Н. Глушанкова, С.В. Созонова, Е.В. Казначеева).

В.В. Косенчук., С.И. Якушев, И.В. Уласов

ВИРУСНАЯ CMV70-3P МИКРОРНК ИНГИБИРУЕТ АУТОФАГИЮ В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ

*ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет),
Москва, Россия*

V.V. Kosenchuk, S.I. Yakushev, I.V. Ulasov

VIRAL CMV70-3P MIRNA SUPPRESSES AUTOPHAGY IN GLIOBLASTOMA CELLS

*Sechenov First Moscow State Medical University,
Moscow, Russia*

ryk357@gmail.com

Медиана выживаемости пациентов с глиобластомой при лечении составляет 14–15 месяцев. В 60–90% образцов в опухолевых клетках персистирует цитомегаловирус (ЦМВ). Было показано, что валганцикловир увеличивает выживаемость пациентов до 24 месяцев. **Гипотеза:** ЦМВ подавляет синтез аутофагосом путем РНК-интерференции и ингибирования ферментов, что снижает активность внутриклеточного противовирусного ответа.

Цель работы — изучить предполагаемые механизмы ингибирования аутофагии в клетках глиобластомы через ЦМВ-индуцируемую вирусную микроРНК.

Материалы и методы. Иммунофлуоресценцией в биоптатах глиобластомы обнаруживали фосфорилированную S6 киназу и IE1 и IE2 ЦМВ. Биоинформатический анализ микроРНК проводили по TCGA, потенциальных мишеней — по STRING. Применяли культуры фибробластов MRC5, астроцитов NHA, клеток глиобластомы U87, U118, U251, инфицированные ЦМВ в дозе 5 MOI или не инфицированные. Передачу микроРНК от клеток с ЦМВ подтверждали добавлением профильтрованного через 0,4 μM и 0,22 μM супернатанта к клеткам, трансфицированным LC3-GFP или РНК26. МикроРНК обнаруживали с помощью qRT-PCR, маркеры аутофагии и экзосом — вестерн-блота.

Результаты. В биоптатах не наблюдали колокализацию аутофагии и экспрессии антигенов ЦМВ. Из 505 образцов TCGA более распространена оказалась UL70-3P. Максимальное подавление аутофагии (накопление LC3-1, анти-аутофагической изоформы) в опытах по передаче вирусной микроРНК наблюдали на 48 ч, что коррелировало с уровнем UL70-3P. Ингибирование RAB27B (задействован в биогенезе экзосом) снижало уровень

про-аутофагической LC3-II изоформы после передачи микроРНК интактным клеткам. После нокдауна RAB27B гена интенсивность флуоресценции РНК26⁺-клеток оказалась ниже, чем в контроле. На 48 ч при сравнении инфицированных MRC5 (пермиссивная инфекция) и U87 (непермиссивная) количество UL70-3P выросло в 12 раз в U87, в MRC5 оставалось неизменным — это подтверждает связь UL70-3P с пермиссивной инфекцией. Комбинация противовирусных препаратов (Валганцикловир, Цидофовир) и OLIGO ингибитора UL70-3P приводит к снижению выживаемости клеток (U251 — на 36–57%, U118 — на 7–11%,) и уровня UL70-3P.

Выводы. Работа показывает, что в глиобластоме ЦМВ способен подавлять аутофагию через передачу неопухолевым клеткам UL70-3P, предположительно, в составе экзосом (исследование продолжается), что может увеличивать миграционную и инвазивную активность опухолей и ингибировать противовирусный ответ клетки.

**А.С. Костина¹, А.М. Киселёв², Д.С. Семёнова^{1,2},
О.Б. Иртыга², А.А. Костарева², А.Б. Малашичева^{1,2}**

NOTCH-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ КЛЕТОК АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА

¹ ФГБУ «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

**A. Kostina¹, A. Kiselev², D. Semenova^{1,2},
O. Irtyuga², A. Kostareva², A. Malashicheva^{1,2}**

NOTCH-DEPENDENT REGULATION OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF AORTIC VALVE INTERSTITIAL CELLS

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

aleksandrakostina1991@gmail.com

Введение. Остеогенная дифференцировка представляет собой сложный многоступенчатый процесс, регулируемый широким спектром факторов на разных уровнях. Сигнальный путь Notch, обеспечивающий межклеточные взаимодействия находящихся рядом клеток, является одним из ключевых молекулярных каскадов, контролирующим остеогенные процессы как в эмбриогенезе, так и во взрослом организме. Нарушение функционирования сигнального пути Notch приводит к патологиям развития аортального клапана, предрасполагающим его к кальцификации. В основе процесса кальцификации створок аортального клапана лежит патологическая остеогенная дифференцировка интерстициальных клеток, конкретные механизмы которой остаются неясными.

Цель. Целью данного исследования является расшифровка Notch-зависимых остеогенных процессов, лежащих в основе патологической остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток аортального клапана.

Материалы и методы. Первичные эндотелиальные и интерстициальные клетки были изолированы из створок аортального клапана здоровых доноров. Остеогенная дифференцировка была индуцирована добавлением среды, содержащей дексаметазон, β -глицерофосфат и аскорбиновую кислоту. Экспрессия интересующих генов

оценивалась методом количественной ПЦР. Сигнальный путь Notch был активирован путем трансдукции клеток лентивирусной конструкцией, несущей NICD — активированный внутриклеточный домен рецептора Notch1. Были сконструированы репортерные люциферазные конструкции для RBPJ, промоторов RUNX2 и SPP1, и мРНК-специфичные шпильки на RBPJ и SNAIL2.

Результаты. Активация сигнального пути Notch в интерстициальных клетках в условиях остеогенной дифференцировки приводила к дозозависимому усилению активности промоторов RUNX2, SPP1 и RBPJ. Ингибирование активности RBPJ и SNAIL2 в интерстициальных клетках клапана в условиях остеогенной дифференцировки приводило к снижению экспрессии проостеогенных маркеров, что выражалось в пониженной эффективности остеогенной дифференцировки. Сокультивирование интерстициальных клеток и эндотелиальных с пониженной активностью RBPJ и SNAIL2 также приводило к ингибированию остеогенной дифференцировки.

Выводы. Транскрипционная активность ключевых проостеогенных маркеров RUNX2 и SPP1 находится под контролем сигнального пути Notch. Эффективность остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток аортального клапана человека дозозависимо регулируется активностью сигнального пути Notch.

Исследование поддержано грантом РФФИ 19-29-04082.

Г.Ю. Кочмарева¹, К.С. Семашенко¹, А.А. Косинова², Т.Н. Субботина¹, А.А. Савченко¹, Ю.И. Гринштейн²

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПРОЯВЛЕНИЕМ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЕ У ПАЦИЕНТОВ С ИБС

¹ ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск, Россия

G.Y. Kochmareva¹, K.S. Semashchenko¹, A.A. Kosinova², T.N. Subbotina¹, A.A. Savchenko¹, Y.I. Grinshtein²

THE GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH A MANIFESTATION OF RESISTANCE TO ACETYSALICYLIC ACID IN PATIENTS WITH CHD

¹ Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

² Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

galya.kochmaryowa@yandex.ru

У людей с ишемической болезнью сердца (ИБС) основным явлением, определяющим выраженность нарушений кровоснабжения органов и тканей, является активация тромбоцитов. В связи с этим, антитромбоцитарная терапия, в частности ацетилсалициловая кислота (АСК), является одним из главных компонентов медикаментозной терапии при ИБС. Однако у отдельных пациентов при лечении АСК сохраняется высокая агрегационная активность тромбоцитов, что обуславливает риск развития тромботических осложнений, в том числе после эндоваскулярного вмешательства.

В настоящее время большое внимание сосредоточено на молекулах клеточной адгезии — Р-селектинах,

которые участвуют в процессах воспалительного ответа. Отмечается, что повышенный уровень экспрессии Р-селектина способствует ускорению свертывания крови и может приводить к развитию ИБС, повышенному воспалительному ответу, и как следствие резистентности к АСК с высоким риском неблагоприятных событий.

Цель работы. Анализ уровня экспрессии гена тромбоцитарного Р-селектина (*SELP*) у пациентов с ИБС.

Материалы и методы. Для оценки экспрессии матричной РНК (мРНК) Р-селектина в тромбоцитах использовалась богатая тромбоцитами плазма (БТП), полученная из цельной венозной крови, из которой выделяли тотальную РНК. Для анализа был использован метод ПЦР, совмещенный с обратной транскрипцией (ОТ) и детекцией результатов в режиме реального времени. В качестве референсного гена выбран конститутивно экспрессирующийся в клетках ген *GAPDH*.

Результаты. Уровень относительной экспрессии был оценен у 18-ти пациентов с ИБС (стабильная стенокардия). Из них для 11-ти человек был проанализирован уровень экспрессии в 2-х точках: до проведения коронарного шунтирования (КШ) и через 7 дней после операции. По результатам исследования уровень экспрессии гена *SELP* варьировался среди пациентов до КШ: от 0,0006 до 0,510 (ср.знач. 0,123±0,11) и через 7 дней после операции: от 0,0078 до 0,632 (ср.знач. 0,240±0,18).

При анализе не было выявлено достоверных отличий в уровнях экспрессии мРНК гена *SELP* в группах пациентов до и после КШ. В то же время, уровень экспрессии исследуемого гена у каждого конкретного пациента после операции был выше по сравнению с соответствующим показателем до оперативного вмешательства.

Заключение. По предварительным данным наблюдается некоторое повышение экспрессии гена Р-селектина после КШ, которое, на данный момент не является достоверно значимым. Полученные показатели могут объясняться особенностями популяции, особой регуляцией экспрессии гена, наличием полиморфизмов в гене Р-селектина у анализируемых пациентов. Таким образом, для достоверной оценки уровня экспрессии Р-селектина при ИБС необходимо увеличить выборку пациентов, а также обследовать всех участников эксперимента на наличие полиморфизмов и других факторов, влияющих на изменение экспрессионного профиля таргетного гена.

Д.В. Курочкин¹, И.Е. Маслюкова¹, Т.Н. Субботина^{1,2}
МЕТОД HRM КАК МЕТОД СКРИНИНГА СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ХМН

¹ ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

² ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России», Красноярск, Россия

D.V. Kurochkin¹, I.E. Maslyukova¹, T.N. Subbotina^{1,2}
HRM METHOD AS A SCREENING METHOD OF THE SOMATIC MUTATION ANALYSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

¹ Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

² Federal Siberian Research and Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Krasnoyarsk, Russia

lejsmie@gmail.com

Хронические миелопролиферативные неоплазии (ХМН) относят к клональным заболеваниям, которые характеризуются неконтролируемой пролиферацией клеточных линий миелопоэза. Установлено, что драйверные мутации в генах *JAK2* и *CALR* лежат в основе патогенеза Ph-негативных ХМН и наблюдаются у 90% больных. На сегодняшний день для диагностики мутаций в данных генах применяются различные молекулярно-генетические методы: секвенирование по Сэнгеру, аллель-специфическая ПЦР, фрагментный анализ и т.д. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки при анализе соматических мутаций. Например, секвенирование по Сэнгеру и фрагментный анализ имеют низкую чувствительность (от 10–25% и 5–10% присутствия мутантного аллеля, соответственно); аллель-специфическая ПЦР в свою очередь имеет ограниченные возможности для обнаружения многочисленных и разнообразных мутаций в гене *CALR*.

В то же время, существует удобный высокочувствительный (от 2,5% мутантного аллеля) метод high resolution melting (HRM-анализ). Его используют для скрининга образцов ДНК на наличие герминальных и соматических мутаций всех типов, встречающихся с разной частотой и разным уровнем аллельной нагрузки среди пациентов с ХМН. При HRM анализе соматических мутаций амплификатор CFX96 (Bio-Rad, США) используют гораздо реже амплификаторов Light Cycler (Roche, Франция).

Цель данной работы — скрининг соматических мутаций в генах *JAK2* и *CALR* у пациентов с ХМН методом HRM-анализа с использованием амплификатора CFX96 для пациентов с диагнозом ХМН.

Для постановки HRM-анализа была взята ДНК от 5 *JAK2* положительных (V617F) и 5 *CALR* положительных пациентов с подтвержденным диагнозом ХМН и ранее определенными мутациями и уровнем аллельной нагрузки, которая была в диапазоне 5–50%. ПЦР-HRM проводили на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Результаты HRM оценивали с помощью программы Precision Melt Analysis™ (Bio-Rad, США).

После проведения кластерного анализа в программе Precision Melt Analysis была видна четкая разница между образцами дикого типа и остальными образцами с мутациями в исследуемых генах. Для гена *CALR* продукты амплификации разделились на 3 кластера: первый кластер — кривые плавления ДНК дикого типа, второй кластер — кривые плавления ДНК от образцов с мутациями по типу инсерции (с.1154_1155insTTGTC и сочетанная с.1128_1129insCTTTGCTT + с.1131_1133delAGA), третий кластер — кривые плавления от образцов с мутациями по типу делеции (с.1092_1143del и с.1099_1150del). Для гена *JAK2* продукты амплификации разделились на 6 кластеров. Первый кластер соответствовал кривым плавления ДНК дикого типа, а остальные пять — кривым согласно своей аллельной нагрузке: второй кластер — образец с уровнем аллельной нагрузки 5%, третий — 15%, четвертый — 20%, пятый — 27%, шестой — 35%.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что HRM является простым и быстрым методом для скрининга соматических мутаций в гене в генах *JAK2* и *CALR*.

Н.И. Литовка, С.Н. Рубцова,
И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова

РЕОРГАНИЗАЦИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ АДГЕЗИОННЫХ КОНТАКТОВ НА РАННИХ ЭТАПАХ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА

ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

N.I. Litovka, S.N. Rubtsova,
I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova

REORGANIZATION OF ACTIN CYTOSKELETON AND ADHERENS JUNCTIONS ON EARLY STAGES OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION

N.N. Blokhin National Medical Research Center
of Oncology, Moscow, Russia

foxcovert9@gmail.com

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) — фундаментальный процесс, необходимый на эмбриональном этапе развития для формирования трёхслойного организма и органогенеза, в постнатальном периоде ЭМП задействован в регенеративных процессах. Изучение ЭМП является важной задачей онкологии, так как ЭМП является ключевой программой опухолевой прогрессии, запускающей инвазию и метастазирование раковых клеток. Нами были проанализированы ранние события ЭМП на модели нормальных эпителиоцитов IAR-2Q, обработанных эпидермальным фактором роста (EGF). Контрольные клетки формировали стабильные линейные адгезионные контакты (АК), ассоциированные с кольцевым актиновым пучком, и демонстрировали выраженный контактный паралич. При индукции ЭМП под действием EGF уже на начальных этапах происходили выраженные динамические изменения. Спустя 5 минут после добавления EGF в среду, на межклеточных границах наблюдалась разборка кольцевого актинового пучка и формирование актиновой сети в составе псевдоподий, происходила утрата контактного паралича, при этом линейные стабильные АК замещались нестабильными E-кадхериновыми радиальными АК. Радиальные АК колокализовались с механосенсорным белком зиксином, что свидетельствует о возникновении натяжения на межклеточных границах. Иммунофлуоресцентное окрашивание выявило во вновь образующихся псевдоподиях эндосомы, содержащие α -катенина. Эти эндосомы не включали E-кадхерин, что, возможно, говорит о разделении пула кадхеринов и катенинов на ранних этапах ЭМП и выполнении ими разных функций в клетке. Так же на межклеточных границах уже через 5 минут после добавления EGF наблюдалось возникновение ретроградного тока, который может быть вовлечён в появление у эпителиальных клеток передне-задней полярности и стимуляцию миграционной активности. Результаты Вестерн-блоттинга показали, что после стимуляции ЭМП возрастало фосфорилирование белка EPLIN, связанного с кольцевым актиновым пучком, что приводит к убиквитинилированию EPLIN и его деградации. Мы предполагаем, что фосфорилирование EPLIN влечет за собой разборку кольцевого актинового пучка, а высвобождающийся мономерный актин идет на построение актиновой сети псевдоподий на межклеточных границах. Таким образом, ранние этапы ЭМП не ограничиваются событиями на свободном крае клеток, но и включают в себя динамические изменения на межклеточных границах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 16-15-10288) и РФФИ (грант № 18-54-16005)

**Е.С. Лылова¹, Е.М. Жидкова¹, Е.М. Кулакова²,
О.А. Власова¹, А.В. Савинкова¹**

**ОЦЕНКА УРОВНЯ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ
ПОВРЕЖДЕНИЙ У РАБОТНИКОВ
ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ОТДЕЛЕНИЙ**

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва, Россия

² Московский Государственный Университет
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**E.S. Lylova¹, E.M. Zhidkova¹, E.M. Kulakova²,
O.A. Vlasova¹, A.V. Savinkova¹**

**ASSESSMENT OF THE LEVEL
OF GENOTOXIC DAMAGES IN WORKERS
OF CHEMOTHERAPEUTIC DEPARTMENTS**

¹ N.N. Blokhin National Medical Research Center
of Oncology, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow,
Russia

e.s.lylova@gmail.com

Актуальность. Рабочая среда медицинских работников НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, реализующих химиотерапевтическое лечение онкопациентов, загрязнена препаратами, многие из которых являются вероятными канцерогенами, а 14 — доказанными [1]. Ежедневная экспозиция к этим препаратам повышает риск онкологических заболеваний, нарушает репродуктивную функцию, приводит к развитию цитотоксических эффектов [2]. Однако оценка влияния химиотерапевтических препаратов на персонал Онкоцентра до настоящего времени проведена не была.

Цель исследования: оценить уровень генотоксических повреждений у медицинских работников, реализующих химиотерапию онкопациентов.

Материалы и методы. Проводили забор крови у медицинских работников и контрольной группы, не контактирующей с химиотерапевтическими препаратами, в трех значимых временных точках: до отпуска (ДО), первый рабочий день после отпуска (ПО) и через месяц после отпуска (МПО). Двунитевые разрывы ДНК оценивали методом ДНК-комет, структурные нарушения хромосом — микроядерным (МЯ) тестом.

Результаты и обсуждение. По результатам ДНК-комет, у 57% медицинских работников в точке ДО и у 43% в точке МПО, индекс повреждений (ИП) был статистически значимо повышен относительно ИП ПО. В контрольной группе наблюдали увеличение числа ДНК-комет ДО у 50%, что связано с особенностями образа жизни участников исследования. В МЯ тесте у 50% работников отмечен статистически значимый уровень МЯ в двуядерных клетках ДО, и снижение данного показателя ПО с сохранением на том же уровне или ниже в точке МПО. В контрольной группе во всех точках количество МЯ было меньше 5%.

Таким образом, постоянный долговременный контакт с химиотерапевтическими препаратами в рамках осуществления профессиональной деятельности приводит к появлению генотоксических повреждений и хромосомным нарушениям у медработников, что потенциально повышает риск развития у них онкологических заболеваний.

Литература:

1. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Available at: Monographs.iarc.fr/ENG/Classification/List of classification.pdf.
2. Соленова Л.Г., Якубовская М.Г. Химиотерапия: возможные риски при обращении с противоопухолевыми препаратами. Успехи молекулярной онкологии. 2017; 4(3): 10–20.

**А.С. Лысенко, Е.С. Селиверстов, Е.В. Зубарева
ВЛИЯНИЕ НОВОГО КЛАССА ИНГИБИТОРОВ
GSK-3 β НА КЛЕТКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ
ЧЕЛОВЕКА**

Белгородский государственный национальный
исследовательский университет, Белгород, Россия

**A.S. Lysenko, E.S. Seliverstov, E.V. Zubareva
INFLUENCE OF A NEW CLASS OF GSK-3 β
INHIBITORS ON HUMAN ADENOCARCINOMA
CELLS**

Belgorod State National Research University, Belgorod,
Russia

anngeneva@yandex.ru

Поиск новых соединений, оказывающих цитотоксический и/или цитостатический эффект на опухолевые клетки, представляет собой перспективную задачу для современной науки. В частности, многообещающими претендентами являются ингибиторы киназы гликогенсинтазы-3 β (GSK-3 β) [1], так как в патологии данный фермент регулирует процессы возникновения рака молочной железы, поджелудочной железы, простаты и других злокачественных новообразований [2].

Целью данной работы явилось изучение воздействия нового класса ингибиторов GSK-3 β на основе 3-циано-4-метил-2,6-диоксопиридинового скаффолда на опухолевые клетки.

Исследуемые соединения были синтезированы в НИЛ органического синтеза и ЯМР-спектроскопии НИУ «БелГУ». Согласно данным ELISA-анализа, ингибиторы способны подавлять активность киназы в концентрациях 0,28 мкм/л и 1 мкм/л для 3-ОН и 4-О-СН3 производных скаффолда соответственно. Исследования проводили на клетках аденокарциномы человека MCF-7, клетки культивировали в 96-луночном планшете в среде DMEM с 5% содержанием FBS в течение 72-х часов. В опытные группы были добавлены 3-ОН и 4-О-СН3 производные в концентрациях 1, 5, 10, 20, 30, 50 мкм/л. Для оценки жизнеспособности использовали метод окрашивания клеток кристаллическим фиолетовым, оптическую плотность раствора определяли на Multiskan FC. Для статистического анализа полученных данных использовали U-критерий Манна-Уитни.

После культивирования клеток с 3-ОН производным в концентрации 5 мкм/л в течение 48 ч. показатель клеточной жизнеспособности достоверно ($p \leq 0.05$) увеличился на 29,8%, при 50 мкм/л — уменьшился на 20,2%; с 4-О-СН3 производным в концентрации 50 мкм/л — уменьшился на 15,2%.

После культивирования клеток с 3-ОН производным в концентрации 1, 5, 30 и 50 мкм/л в течение 72 ч. показатель жизнеспособности достоверно ($p \leq 0.05$) уменьшился на 20,6%, 21,3%, 24,8% и 30,7% соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования нового класса ингибиторов GSK-3 β на основе 3-циано-4-метил-2,6-диоксопиридинового

скаффолда для разработки химиотерапевтических препаратов и необходимости дальнейшего изучения.

Литература:

1. McCubrey J., Steelman L., Bertrand F. et al. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget*. 2014; 5(10): 2881–911.
2. Domoto T., Pyko I., Furuta T. et al. Glycogen synthase kinase-3 β is a pivotal mediator of cancer invasion and resistance to therapy. *Cancer Sci*. 2016; 107(10): 1363–72.

**А.В. Майтова^{1,2}, А.В. Гризель¹, А.Е. Зобнина^{1,3},
Н.А. Горшенева^{1,2}, А.А. Рубель^{1,2,3}, Ю.О. Чернов^{1,4}**

КОНСЕРВАЦИЯ И ДИВЕРГЕНЦИЯ ПРИОННЫХ СВОЙСТВ БЕЛКА SUP35 ИЗ РАЗНЫХ ВИДОВ ДРОЖЖЕЙ

¹ Научная лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-технологический университет Сириус, Сочи, Россия

⁴ School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

**A.V. Maitova^{1,2}, A.V. Grizel¹, A.E. Zobnina^{1,3},
N.A. Gorsheneva¹, A.A. Rubel^{1,2,3}, Y.O. Chernoff^{1,4}**

CONSERVATION AND DIVERGENCE OF THE PRION PROPERTIES OF SUP35 PROTEINS FROM VARIOUS YEAST SPECIES

¹ Laboratory of Amyloid Biology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

² Department of Genetics and Biotechnology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

³ Sirius Institute of Science and Technology, Sochi, Russia

⁴ School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

maynastia@mail.ru

Многие заболевания человека и животных связаны с агрегацией белков, частности с образованием упорядоченных фибриллярных агрегатов (амилоидов) и их инфекционных вариантов (прионов), отличительной особенностью которых является способность распространяться между клетками и организмами. Прионные белки также обнаружены у низших эукариот, таких как дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи активно используются как модель для изучения общих механизмов образования и передачи прионов. Наиболее хорошо изучен прион [PSI⁺], образуемый белком Sup35 (фактором терминации трансляции).

Гомологи белка Sup35 из других видов дрожжей (или их прионные домены) могут агрегировать в клетках *S. cerevisiae*, и некоторые из них индуцируют формирование прионной формы эндогенного белка Sup35, хотя при сильной дивергенции белков этот процесс затруднён из-за так называемого «видового барьера». При этом, возможность межвидовой передачи прионных свойств не обязательно коррелирует со степенью эволюционного родства видов дрожжей и уровнем идентичности белковых последовательностей. В частности,

при отсутствии индукции приона Sup35 *S. cerevisiae* пронными доменами дрожжей *Naumovosima castellii* и *Lachancea kluyveri*, наблюдается индукция приона Sup35 *S. cerevisiae* прионным доменом более удалённого вида *Ogataea methanolica*. Мы предполагаем, что белок *O. methanolica* индуцирует конверсию белка Sup35 *S. cerevisiae* в прион по механизму вторичной нуклеации (через взаимодействие неидентичных последовательностей со сходными свойствами).

Мы также показали, что параметры агрегации белка Sup35 зависят от клеточного окружения. Например, прионный домен белка Sup35 из эволюционно удалённого вида дрожжей *Lachancea kluyveri* образует преимущественно точечные агрегаты при сверхпродукции в клетках *S. cerevisiae*, тогда как сверхпродукция эндогенного белка Sup35 *S. cerevisiae*, как было показано ранее, первоначально приводит к образованию ленточных структур, представляющих собой промежуточную стадию формирования приона. Однако в клетках *L. kluyveri*, прионный домен Sup35 *L. kluyveri* формирует как точечные, так и ленточные агрегаты. Таким образом, формирование ленточных структур происходит при агрегации белка в клетках того же, но не другого вида.

Выяснение механизма возникновения и распространения гетерологичных прионов с использованием дрожжевой модели способствует пониманию основ распространения прионов в других организмах, а также разработке мер для выявления и лечения амилоидных и прионных заболеваний человека.

Работа выполняется при поддержке гранта РФФИ 18-74-00041 и при технической помощи ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС», «Биобанк» и «РМИКТ» Научного парка СПбГУ.

**С.А. Макеёнок^{1,2}, Л.С. Шуйский¹,
А.В. Шалыгин¹, Е.В. Казначеева¹, К.О. Гусев¹**

ИЗМЕНЕНИЕ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

**S.A. Makeenok^{1,2}, L.S. Shuyskiy¹, A.V. Shalygin¹,
E.V. Kaznacheyeva¹, K.O. Gusev¹**

CHANGE OF STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY IN DIABETIC NEPHROPATHY

¹ Institute of cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Peter The Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

makeyonoksophie@yandex.ru

Одним из наиболее распространенных и тяжелых осложнений сахарного диабета (СД) является диабетическая нефропатия (ДН). У больных СД второго типа диабетическая нефропатия занимает третье место среди причин смерти после заболеваний сердечно-сосудистой системы и онкологических патологий. Причинами ДН могут быть как повреждения артериол, так и повреждения фильтрующих структур в почке. Полученные экспериментальные и клинические данные убедительно доказывают, что основополагающую роль в развитии диабетической нефропатии играет гибель подоцитов — эпителиальных клеток, образующих щелевую

диафрагму в гломеруле. Изучение нарушений работы ионных каналов в подоцитах при ДН — актуальная задача, которая может позволить выделить перспективные мишени для коррекции данной патологии.

Основное внимание в нашем исследовании было уделено влиянию СД второго типа у крыс на кальциевый гомеостаз в изолированных клубочковых подоцитах. Для индукции диабета второго типа крысам линии Wistar в течение 15 недель давали диету с высоким содержанием жира и одноразовую инъекцию 20 мг/кг стрептозотоцина через 9 недель. Этот протокол привел к нарушению толерантности к глюкозе у крыс, повышению уровня глюкозы, повышению креатининового клиренса. Для приведенных исследований гломерулы крыс были выделены по стандартному протоколу просеивания и нанесены на стеклянные покровные стекла, покрытые полилизинном. Далее эти гломерулы были погружены в раствор, содержащий 2 мкМ флуоресцентного индикатора кальция Fura-2 AM в течение 50 минут. Изменения цитоплазматической концентрации Ca^{2+} были измерены с помощью отношения интенсивностей флуоресценции зонда при 340- и 380-нм возбуждающей длины волны. Используя флуоресцентный метод, было показано, что подоциты в гломерулах от крыс с СД второго типа имеют более низкий уровень входа Ca^{2+} , в ответ на опустошение Ca^{2+} депо, вызванное применением 2 мкМ тапсигаргина (ΔF : $0,49 \pm 0,03$ против $0,38 \pm 0,02$ а. е. для контрольных крыс и крыс с СД второго типа соответственно). В то же время базальный уровень внутриклеточного кальция и вход кальция, индуцированный ангиотензином II, не изменился (F_{basal} : $0,61 \pm 0,01$ против $0,6 \pm 0,01$ и ΔF : $0,13 \pm 0,01$ против $0,16 \pm 0,01$, для контрольных крыс и крыс с СД второго типа соответственно).

Таким образом, были получены результаты, что СД второго типа влияет на депо-управляемый вход кальция в подоцитах. Следовательно, в условиях патологии в подоцитах наблюдаются нарушения в кальциевом гомеостазе. Такие изменения могут приводить к отклонениям в работе клубочкового фильтрационного барьера и развитию ДН.

Работа поддержана грантами РФФИ 19-14-00114 и РФФИ № 19-315-90065.

М.А. Малинчик¹, О.С. Коноплева^{1,2},
Горбачева Н.Н.¹, М.В. Смольникова¹

ПОЛИМОРФИЗМ *IL13* RS1800925 ПРИ ДЕТСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

¹ ФИЦ КНЦ СО РАН НИИ медицинских проблем
Севера, г. Красноярск, Россия

² Красноярский государственный медицинский
университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого,
г. Красноярск, Россия

M.A. Malinchik¹, O.S. Konopleva^{1,2},
N.N. Gorbacheva¹, M.V. Smolnikova¹

POLYMORPHISM *IL13* RS1800925 IN THE CHILD BRONCHIAL ASTHMA

¹ FRC KSC SB RAS Scientific Research Institute
of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk,
Russia

² Krasnoyarsk State Medical University named after
Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

seapearl1995@gmail.com

Получен ряд ассоциативных связей полиморфизма генов цитокинов, продуцируемых разными видами клеток иммунной системы, с развитием бронхиальной астмы (БА). Интерлейкин-13 участвует в аллергическом воспалении, повышении гиперчувствительности бронхов, уровня эозинофилов и продукции IgE В-клетками, что делает перспективным изучение полиморфизмов *IL13* при БА в зависимости от характера развития заболевания.

Цель: оценить ассоциацию между rs1800925 *IL13* и БА с различным уровнем контроля и степенью тяжести заболевания у детей европеоидного происхождения Восточной Сибири.

Группу обследуемых составили дети, страдающие бронхиальной астмой: тяжелая/среднетяжелая БА с неконтролируемым течением заболевания (НБА, n=107) и среднетяжелая БА с контролируемым течением заболевания (КБА, n=95) и популяционная выборка г. Красноярск (n=135). Выделение ДНК проводилось сорбентным методом, генотипирование *IL13* (rs1800925) осуществлялось при помощи метода RT-PCR. Сравнение частот аллелей и генотипов проводили с помощью online-калькулятора, теста χ^2 -квadrat. Отношение шансов (OR) с 95 %-ным доверительным интервалом (ДИ) проводилось для связи генетических маркеров с фенотипами патологии.

Показано, что частота генотипа *CT* у больных среднетяжелой неконтролируемой БА статистически значимо выше, чем в контрольной группе (46,6% / 36,3%, 1,51 [1,03–2,19], p=0,033). Получены статистически значимые отличия при сравнении частоты генотипа *TT* между группой с тяжелой БА и группой контроля (15,5% / 6,7%, OR 1,65 [1,06–2,56], p=0,027). Таким образом, можно предположить, что генотип *CT* ассоциирован со среднетяжелой неконтролируемой БА, а генотип *TT* ассоциирован с тяжелой БА. Полученные нами данные согласуются с результатами других авторов. Так, Liu Z. *et al.* выявили ассоциацию между rs1800925 *IL13* и риском развития БА у детей, так как генотипы *CT* и *TT* встречались чаще в группе больных. Radhakrishnan A. *et al.*, исследовав rs1800925 *IL13* у взрослого населения Малайзии, выяснили, что частота аллеля *T** в группе больных значимо превышает частоту этого аллеля в контрольной группе. Таким образом, результаты нашего исследования подтверждают, что rs1800925 *IL13* ассоциирован с тяжестью и уровнем контроля астмы.

Т.А. Марусова^{1,2}, А.В. Моршнева¹,
О.О. Гнедина¹, М.В. Иготти¹

ВЛИЯНИЕ РОТЕНОНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ РАКОВЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный
Университет, Санкт-Петербург, Россия

T.A. Marusova^{1,2}, A.V. Morshneva¹,
O.O. Gnedina¹, M.V. Igotti¹

THE EFFECT OF ROTENONE ON THE PROLIFERATION OF TUMOR AND TRANSFORMED CELLS

¹ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences,
Saint-Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg,
Russia

tamaramarusova@gmail.com

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (ИГД) являются перспективными агентами для химиотерапии опухолевых заболеваний [1]. Однако препятствием для успешного лечения является развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Наиболее распространенной причиной МЛУ считается повышенная экспрессия АТФ-зависимых трансмембранных переносчиков молекул [2], что вызывает снижение внутриклеточной концентрации лекарственного средства. Совместное применение терапевтических препаратов и агентов, понижающих количество внутриклеточного АТФ, таких как ротенон, может быть перспективным подходом для преодоления МЛУ.

Было показано, что ингибитор дыхательной цепи митохондрий ротенон индуцирует апоптоз в некоторых линиях раковых клеток [3], однако механизм индукции апоптоза пока не ясен. Цель работы заключалась в изучении влияния ротенона на опухолевые клеточные линии с мутациями гена *ras* (аденокарцинома кишечника человека НСТ116 и трансформированные онкогенами E1A+Ras эмбриональные фибробласты мыши), а также клетки, экспрессирующие нормальный Ras (рак молочной железы MCF7). В качестве контроля использовали мышинные фибробласты NIH/3T3 и эмбриональные клетки почки человека HEK293. Методом проточной цитометрии мы показали, что ротенон вызывает замедление клеточного цикла на границе фаз G2/M клеточного цикла. Для исследования влияния ротенона на жизнеспособность клеток был использован МТТ-тест, который показал, что наименее чувствительными к ротенону являются условно нормальные клетки (HEK293, NIH/3T3). Наибольшую чувствительность проявляют раковые клетки с диким Ras (MCF7). Опухолевые клетки с мутантным Ras (НСТ116) и трансформанты E1A+Ras мало чувствительны к ротенону. Результаты кривых роста согласуются с результатами, полученными с помощью МТТ-теста. На основании полученных результатов можно предположить, что опухолевые клетки с нормальным и активированным Ras отличаются по чувствительности к ротенону. Таким образом, ротенон может быть использован в терапии опухолей с нормальным Ras.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-015-00230.

Литература:

1. Mottamal M., Zheng S., Huang T. L. and Wang G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules*. 2015. 20: 3898–3941.
2. Arnanson T., Harkness T. Development, maintenance, and reversal of multiple drug resistance: At the crossroads of TFPI1, ABC transporters, and HIF1 α . *Cancers*. 2015. 7: 2063–2082
3. Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis G., Rajwa B., Melendez A., Robinson P. Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Journal of Biological Chemistry*. 2003. 278: 8516–8525

**И.В. Межевова, В.И. Вошедский,
Е.А. Дженкова, Е.С. Бондаренко,
М.А. Командиров, А.О. Ситковская**

ВЛИЯНИЕ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК РАКА ЛЕГКОГО H1299

*ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России,
Ростов-на-Дону, Россия*

**I.V. Mezhevova, V.I. Voshedskii, E.A. Dzhenkova,
E.S. Bondarenko, M.A. Komandirov, A.O. Sitkovskaya**
**STUDYING THE EFFECT OF RADIATION
THERAPY ON LUNG CANCER CULTURE CELL
H1299**

*National Medical Research Center for oncology,
Rostov-on-Don, Russia*

mezhevova88@gmail.com

Цель. В России рак легкого занимает первое место в структуре заболеваемости онкологией среди мужчин, третье место в структуре общей заболеваемости. Предпочтительной терапией рака легкого остается комбинация методов химиотерапии в сочетании с лучевой терапией. Лучевая терапия оказывает влияние на ядерный аппарат опухолевых клеток и молекулу ДНК, воздействуя на клеточный цикл, вызывая такие эффекты, как апоптоз, некроз, аномальный митоз. Целью нашей работы являлось изучение эффекта лучевой терапии в дозе от 18 до 24 Грей на выживаемость и апоптотическую активность клеточной линии немелкоклеточного рака легкого H1299.

Материалы и методы. Исследование проводили на культуре немелкоклеточного рака легкого H1299, любезно предоставленной коллегами из коллекции ФГБУ Российский научный центр рентгенодиагностики Минздрава России. В культуральные флаконы с площадью поверхности 75 см² (Corning, USA) пассировали клетки H1299 по 5*10⁶ кл./фл в среду DMEM (Gibco, USA) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Биолот, Россия), 0,5% гентамицина (Биолот, Россия). Клеточную линию культивировали 24 ч в инкубаторе Binder (Германия) при 37°C, 5% CO₂. Облучение клеточной линии H1299 проводили на линейном ускорителе NovalisTx, Varian дозами от 18 до 24 Гр (шаг1), контроль оставляли без облучения. Экспозицию проводили в течение 24 ч при 37°C, 5% CO₂. Жизнеспособность клеток определяли в автоматическом анализаторе EVE (NanoEntec, Корея). Оценку апоптотической активности проводили на проточном цитофлуориметре FACSCantoll (BD, США) с использованием набора Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen, США).

Результаты. Наибольший процент живых клеток наблюдали в контроле (95,9%). При воздействии суммарной дозой облучения (СОД) 24 Гр процент живых клеток составил 91,6%. В группах с СОД от 20 до 24 Гр (шаг1) регистрировали наибольший процент клеток на ранней стадии апоптоза (от 5% до 5,7%). Клетки, находящиеся на поздней стадии апоптоза, определяли в группах с диапазонами облучения от 21 до 24 Гр (шаг1) (от 2,4 до 2,5%).

Заключение. Полученные данные показали, что при воздействии на клеточную линию H1299 СОД более 20 Гр (до 24Гр) уровень апоптоза выше, чем при подведении СОД 18, 19 Гр, что свидетельствует о проапоптотической активности данного вида излучения.

Е.П. Минина¹, А.К. Величко², О.Л. Кантидзе²
**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИ(PR)-
 ПЕПТИДА НА КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЮ
 КЛЕТОЧНОГО ЯДРА**

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики,
 Московский государственный университет
 им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт биологии гена Российской академии наук,
 Москва, Россия

Е.Р. Minina¹, А.К. Velichko², O.L. Kantidze²
**INVESTIGATION OF POLY(PR)-PEPTIDE
 INFLUENCE ON THE CELL NUCLEUS
 COMPARTMENTALIZATION**

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics,
 Lomonosov Moscow State University, Moscow,
 Russia

² Institute of Gene Biology, Russian Academy
 of Sciences, Moscow, Russia

lisa.minina@gmail.com

Наиболее частой причиной развития таких нейродегенеративных заболеваний, как фронтотемпоральная деменция и боковой амиотрофический склероз, является увеличение числа повторов GGGGCC в гене *C9orf72*, в результате чего в его белковом продукте увеличивается количество повторов пролин-аргинин (PR). Недавно на генетически-модифицированных мышах, экспрессирующих зелёный флуоресцентный белок (GFP), сшитый с фрагментом из пятидесяти PR-повторов, было показано, что накопление в нейронах поли(PR)-пептида приводило к нарушениям в организации гетерохроматина [1].

Для детального изучения причин токсичности поли(PR)-пептида на клеточном уровне на основе вектора pTagGFP-C2 была создана плаزمид, кодирующая GFP с дополнительными 50 PR-повторами (далее — поли(PR)-пептид). Полученная плазмид была использована для временной экспрессии поли(PR)-пептида в клетках HeLa и фибробластах человека. С помощью флуоресцентной микроскопии было показано, что поли(PR)-пептид локализуется преимущественно в ядрышке. Окрашивание антителами к ядрышковым белкам B23 и нуклеолину продемонстрировало, что в условиях гиперэкспрессии поли(PR)-пептида они не покидают ядрышко под действием камптотецина, в нормальных условиях вызывающего выход B23 и нуклеолина в нуклеоплазму. С помощью окрашивания антителами к HP1, маркерному белку гетерохроматина, было установлено, что в условиях гиперэкспрессии поли(PR)-пептида гетерохроматин претерпевает некоторые изменения. С целью выяснения детальной картины изменений в структуре хроматина под действием поли(PR)-пептида планируется изучить структуру хроматина с помощью метода Hi-C в клетках HeLa с временной экспрессией поли(PR)-пептида. Планируется создание стабильной клеточной линии, экспрессирующей поли(PR)-пептид, на основе линии HeLa с целью изучения эффектов долговременной гиперэкспрессии поли(PR)-пептида.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 17-74-20030 и РФФИ 17-00-00098.

Литература:

1. Zhang, Yong-Jie et al. Heterochromatin anomalies and double-stranded RNA accumulation underlie *C9orf72* poly(PR) toxicity. *Science* 2019; 6428(363): eaav2606.

А.С. Миценых¹, Е.В. Абакушина²
**ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЭМБРИОНОВ
 ПОСЛЕ ВИТРИФИКАЦИИ**

¹ ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии (ВНИИРАЭ),
 Обнинск, Россия

² ООО «АРТ БиоВет», Обнинск, Россия

A.S. Mitsenyk¹, E.V. Abakushina²
**EVALUATION OF VIBILITY OF EMBRYOS AFTER
 VITRIFICATION**

¹ Russian Institute of Radiology and Agroecology
 (RIRAE), Obninsk, Russia

² LLC Art BioVet, Obninsk, Russia

micenyk-anastasi@mail.ru

Витрификация эмбрионов млекопитающих, в частности человека, на сегодняшний день является перспективным методом для сохранения генетического материала и успешной приживляемости размороженных эмбрионов после трансплантации [1, 2]. В связи с этим разработка оптимального метода витрификации эмбрионов на модели млекопитающих актуальна как для репродуктивной медицины, так и для животноводства.

Для исследования отобрали 50 ооцитов с хорошей морфологией категории А и разной степенью зрелости. После процедуры дозревания (IVM) их подвергли оплодотворению *in vitro* с помощью семени крупного рогатого скота (КРС). Витрификацию эмбрионов осуществляли в средах с разными криопротекторами в несколько этапов. После хранения в криобанке опытные образцы разморозили и провели как морфологическую оценку жизнеспособности, так и их флуоресцентный анализ при помощи Hoechst 33342, окрашивающий ДНК клеточного ядра, и специального кита для мертвых/апоптотических клеток (PI/Alexa Fluor 488 Annexin, Molecular Probes).

В результате оплодотворения *in vitro* получили 32 эмбриона (64,0%). Морфологический анализ эмбрионов после витрификации показал, что у 27 эмбрионов (86,4%) морфология схожа с нативными. Оценка эмбрионов КРС на апоптоз (Annexin) показала, что доля дегенеративных эмбрионов, окрашенных в зелёный цвет, составила 13,6% (5/32). Что не противоречит данным ни морфологического анализа, ни визуализированное Hoechst начало фрагментации ядер бластомеров, характерное для апоптоза. Отсутствие окраски бластомеров PI показало, что целостность блестящей оболочки после витрификации не нарушилась.

Таким образом, использованный в работе метод витрификации и анализ жизнеспособности эмбрионов млекопитающих при помощи флуоресцентных красителей PI, Annexin и Hoechst могут успешно использоваться в программах вспомогательных репродуктивных технологий репродуктивной медицины.

Благодарности: работа была поддержана Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (грант № 14269ГУ/2019).

Литература:

1. Liebermann J. Vitrification of Embryos. *In Vitro Fertilization* 2019; 701–712.
2. Souza J.F., Oliveira C.M., Lienou L.L. et al. Vitrification of bovine embryos followed by *in vitro* hatching and expansion. *Zygote* 2017; 26(01): 99–103.

А.С. Могиленских^{1,2}, Е.О. Шамшурина¹

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КЛЕТОК
КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
ТРОЙНОГО НЕГАТИВНОГО ПОДТИПА
В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ**

¹ ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, Екатеринбург, Россия

² ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия

A.S. Mogilenskikh^{1,2}, E.O. Shamshurina¹

**DETERMINATION MORPHOLOGICAL
EVALUATION OF BREAST CARCINOMA CELLS
TRIPLE NEGATIVE SUBTYPE IN PRIMARY
CULTURE**

¹ Institute for medical cell technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

² Ural state medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

annasajler@yandex.ru

Введение. При культивировании клеток карциномы молочной железы (КМЖ) наблюдается гетерогенность клеточного состава и изменение преобладающей формы клеток в каждом пассаже.

Задачи. Определение изменения морфологии клеток КМЖ при культивировании.

Материалы и методы. Биоптат КМЖ транспортировали в лабораторию. Фрагменты образца помещали в среду для диссоциации и инкубировали около 20 часов при 37 °С и отсутствии CO₂. Далее образец центрифугировали 3 минуты при 200g (осадок В), затем переносили супернатант и центрифугировали 5 минут при 350g (осадок С). Полученные осадки В и С смешивали, ресуспендировали с трипсином и центрифугировали при тех же оборотах. Затем ресуспендировали с диспазой и ДНКазой, смешивали с HF (раствор Хэнкса с 2% FBS) и центрифугировали. Полученный осадок разводили с полной средой Mattnocult и клетки высаживали в 5мл флакон, предварительно покрытый коллагеном. При пересадке клетки (каждые 7–10 дней) обрабатывали трипсином, центрифугировали при 350g и ресуспендировали со средой Mattnocult. Для морфологического исследования клетки окрашивали гематоксилином-эозином, иммуногистохимические реакции осуществлялись в автостейнере «Ventana».

Результаты. Первичная опухоль при иммуногистохимическом исследовании отнесена к тройному негативному подтипу (ER-, PR-, HER2/neu -, Ki – 50%).

При морфологической оценке первого пассажа отмечено четыре группы клеток: большую часть (50,1%) составляли эпителиоподобные клетки, плотно прилегающие друг к другу, меньшую — фибробластоподобные с нечеткими границами (20,7%), макрофагоподобные клетки (18,8%), округлые (10,4%). Во втором пассаже количество эпителиоподобных клеток значительно уменьшилось (15,5%), за счет увеличения количества фибробластоподобных клеток с нечеткими границами (62,1%). Мелкие округлые клетки в данном пассаже единичны (3,2%). В третьем пассаже сохранялась тенденция к увеличению доли клеток с фибробластоподобным фенотипом (77%) на фоне еще большего уменьшения эпителиоподобных и мелких округлых клеток (7% и 3.3% соответственно). В четвертом пассаже при морфологическом анализе было обнаружено увеличение доли округлых клеток (61,9%) за счет уменьшения

фибробластоподобных клеток (23,2%). Кроме того, наблюдалось уменьшение размеров макрофагоподобных клеток при относительном сохранении их доли во всех пассажах (18,8%, 19,1%, 12,7%, 14,9%).

Заключение. При культивировании клеток карциномы молочной железы тройного негативного подтипа отмечается увеличение фибробластоподобных клеток на втором и третьем пассаже.

Работа выполнена в рамках государственного задания УГМУ № 056-00151-18-00.

Е.И. Моргун^{1,2}, О.С. Роговая^{2,3},
К.К. Сухинич³, Е.А. Воротеляк^{3,4}

**ОБРАЗОВАНИЕ РУБЦА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ
ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ
В МОДЕЛИ ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩЕЙ
РАНЫ**

¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

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

³ Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E.I. Morgun^{1,2}, O.S. Rogovaya^{2,3},
K.K. Suchinich³, E.A. Vorotelyak^{3,4}

**SCAR FORMATION UNDER AN INFLUENCE
OF TISSUE-ENGINEERED DESIGN IN NON-
HEALING SKIN WOUND MODEL**

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgopudny, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Russia

³ Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

lady.morgun2016@yandex.ru

Целью нашего исследования было изучение воздействия тканеинженерной конструкции «Биологический эквивалент кожи» (БЭК) на образование рубца в мышинной модели ишемизированной длительно незаживающей раны.

Тканеинженерная конструкция «БЭК» включает в себя мышинные МСК и кератиноциты, культивируемые на носителе, содержащем коллаген и гиалуроновую кислоту. Эксперимент проводили на мышах линии balb/c. Манипуляции с животными осуществляли под общим наркозом с одобрения Комиссии по биоэтике ИБР РАН. Мыши были разделены на три группы: «открытая рана», «носитель» и «БЭК». Всем мышам хирургическим путем формировали на спине H-образный кожный лоскут с параметрами 10x30 мм с раной 5–7 мм по центру. Далее животным из групп «носитель» и «БЭК» трансплантировали гиалуроносодержащий носитель и БЭК соответственно. Раны промывали на 3–5 сутки после операции стерильным 0.7% раствором гентамицина на DPBS.

На 14 сутки в раневом ложе у мышей всех групп был сформирован рубец. В группе «контроль» раневое ложе располагалось значительно ниже краев раны, что может

свидетельствовать о формирующемся косметическом дефекте. Коэффициент сглаживания (КС) показывает отношение толщины зоны ремоделирования ткани раневого ложа к дерме краёв раны. Морфометрический и статистический анализ показал, что КС мышей из групп «БЭК» достоверно выше, чем КС из группы контроль. Это свидетельствует о том, что трансплантация БЭК способствует регенерации длительно незаживающей раны без косметического дефекта.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках Госзадания ИБР РАН на 2020 год.

**А.А. Мурылёва^{1,2}, С.Л. Воробьев³,
Е.О. Синегубова¹, А.В. Слита¹**

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

³ Национальный центр клинической морфологической диагностики, Санкт-Петербург, Россия

**A.A. Muryleva^{1,2}, S.L. Vorobyov³,
K.O. Sinigubov¹, A.V. Slita¹**

OBTAINING AND CHARACTERIZING THE CELL LINE OF HUMAN GASTRIC ADENOCARCINOMA

¹ Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

³ National center for clinical morphological diagnostics, Saint-Petersburg, Russia

anna.myruleva.a@gmail.com

Из эксплантата опухоли методом «переживающей культуры» была получена линия клеток аденокарциномы желудка человека.

Путем гистологического анализа было выявлено, что опухоль представляет собой недифференцированную аденокарциному желудка. При проведении иммуногистохимического исследования в клетках была показана ядерная экспрессия белка p53, что характерно для низкодифференцированных опухолей. Клетки демонстрируют высокий индекс пролиферативной активности — Ki67 до 85%.

Культивирование клеток проводили в флаконах (Nunc), в питательной среде. DMEM (Thermo Fisher) с добавлением 10% сыворотки плода коровы (Gibco).

Клетки обладают типичной для эпителиальной ткани морфологией, имеют очаговый характер роста, образуя плотные островки, которые впоследствии сливаются в монослой. Характеризуются высокой степенью вакуолизации. Проведя иммуногистохимический анализ клеточной линии был показан еще более высокий индекс пролиферативной активности- Ki67 до 95%.

Клетки аденокарциномы желудка обычно отличаются высоким уровнем экспрессии цитokerатинов 7 и 20. Клетки полученной культуры характеризуются отсутствием экспрессии этих белков, также они не экспрессируются и в клетках самой опухоли. Эта особенность указывает на соответствие клеток полученной культуры исходному материалу.

Клеточные кластеры представлены полиморфными, атипичными, отдельными резко анаплазированными клетками с крупными ядрами, грубым глыбчатым хроматином, выступающими ядрышками, неравномерной, частью васкуляризированной цитоплазмой, единичными перстневидными клетками и наличием патологических митозов. Эти же черты присутствуют и в операционном материале.

Была проведена оценка чувствительности клеточной культуры к действию противоопухолевых препаратов: 5-фторурацил (Veropharm, Россия), цисплатин (Teva, Израиль) лейковорин (Veropharm, Россия). В результате проведенных экспериментов было показано, что исследуемая линия клеток резистентна к этим препаратам.

Таким образом, в результате работы была получена линия клеток недифференцированной аденокарциномы желудка человека кишечного типа.

**О.В. Надей, Н.И. Агалакова
ГИПЕРСТИМУЛЯЦИЯ СИГНАЛЬНОГО
КАСКАДА КАЛЬПАИНА-1 КАК
ОДНА ИЗ ПРИЧИН СНИЖЕНИЯ
КОГНИТИВНЫХ СПОСОБНОСТЕЙ У КРЫС
С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ФЛЮОРОЗОМ**

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

**O.V. Nadei, N.I. Agalakova
HYPERSTIMULATION OF CALPAIN-1 SIGNALING
CASCADE AS ONE OF THE CAUSES
OF COGNITIVE DECLINE OF RATS WITH
EXPERIMENTAL FLUOROSIS**

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

olganadej@gmail.com

Избыточное поступление неорганического фтора в организм вызывает разнообразные неврологические и когнитивные расстройства. Как известно, F способен увеличивать содержание свободного Ca²⁺ в цитоплазме клеток, а среди множества внутриклеточных эффекторов Ca²⁺ можно выделить протеазы кальпаин-1 и кальпаин-2, активация которых является одним из ключевых механизмов долговременной потенциации, лежащей в основе обучения и формирования памяти. Целью данной работы было изучить взаимосвязь между развитием экспериментального флюороза, когнитивными способностями крыс и экспрессией некоторых сигнальных молекул кальпаин-зависимых каскадов формирования памяти в гиппокампе.

Самцы крыс линии Wistar в течение года получали воду *ad libitum* с 5, 20 и 50 мг/л F (в виде NaF). Маркером развития флюороза считали нарушение минерализации зубов в виде белых пятен. Способность животных к пространственному обучению оценивали с помощью водного теста Морриса, а формирование памяти — в тесте распознавания нового объекта. Изменения экспрессии сигнальных

молекул каскадов кальпаина-1 и кальпаина-2 определяли методом вестерн-блоттинга в гомогенатах гиппокампа.

Длительное потребление крысами высоких доз F не оказывало достоверного влияния на формирование кратковременной, но приводило к дефициту долговременной памяти. Интоксикация животных 5–50 мг/л F вызывала дозо-зависимую стимуляцию кальпаина-1, в процессе которой происходила его транслокация из цитозоля к мембранам. Этот процесс сопровождался активацией одного из эффекторов кальпаина-1 — ГТФазы RhoA. Кроме того, потребление 20–50 мг/л F индуцировало протеолитическую деградацию (стимуляцию) второго субстрата кальпаина-1 — фосфатазы PHLPP1, а также увеличивало экспрессию фосфорилированной формы протеинкиназы ERK1/2. В противоположность этому, длительная интоксикация животных F не оказывала достоверного влияния на активность кальпаина-2 и его эффекторов — фосфатазы PTEN и киназы mTOR. Однако в клетках гиппокампа крыс, получавших избыток F, дозо-зависимо снижалась экспрессия нейротрофического фактора CREB и транскрипционного фактора BDNF, функционирование которых необходимо для стимуляции кальпаина-2. Таким образом, в основе снижения когнитивных способностей животных лежит гиперстимуляция кальпаина-1 и его эффекторов на фоне стабильной активности кальпаина-2, что свидетельствует о нарушении связи между ранней и поздней фазами долговременной потенциации.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290371-3).

А.В. Ноздрачева^{1,2}, Н.М. Плещак², М.Л. Куранова²

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, ЯДЕРНОЙ ЛАМИНЫ И ФЕРМЕНТА β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ В ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАЗВИТИИ РАКА И УСКОРЕННОМ СТАРЕНИИ

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

² Институт цитологии РАН

A.V. Nozdracheva^{1,2}, N.M. Pleskach², M.L. Kuranova²

STUDY OF THE CELL CYCLE, NUCLEAR LAMINE AND β-GALACTOSIDASE ENZYME IN HUMAN DERMAL FIBROBLAST DURING THE DEVELOPMENT OF CANCER AND ACCELERATED AGING IN

A.V. Nozdracheva^{1,2}, N.M. Pleskach², M.L. Kuranova²

¹ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University

² Institute of Cytology RAS

miryakuranova@gmail.com

В работе исследовались клеточные линии дермальных фибробластов двух пациентов с раком молочной железы РМЖ30 и РМЖ55 (30 и 55 лет); трёх пациентов с риском развития опухоли: носительница мутации 5382insC (c.5266dup) в гене *BRCA1* 30 лет (BRCA1SP) и гетерозигонные носители мутации в гене *ATM*, мамы пациентов атаксии-телеангиэктазии 37 и 39 лет (AT8MSP и AT9MSP) соответственно; а также линии пациентов с синдромом ускоренного старения Синдром Коккейна 2 и 8 лет (CS7SP и CS6SP) соответственно. В качестве контроля использовались линии от здоровых доноров 2,5, 30 и 55 лет.

В исследуемых линиях методом проточной цитометрии были изучены клеточный цикл и построена кривая роста; методом непрямой иммунофлюоресценции исследованы состояние ядерной ламины при помощи окрашивания антителами к LMNA A/C; при помощи коммерческого набора для окрашивания ассоциированной со старением фермента бетагалактозидазы (SA-β-gal) определялось количество фермента. Результаты исследования изменения доли клеток фаз клеточного цикла спустя 1 и 3 сутки после посева одинакового числа клеток во всех линиях и сопоставления данные с кривой роста выявило существенное снижение пролиферативной способности клеток в линиях группы риска развития рака BRCA1SP, AT8MSP и AT9MS. При исследовании накопления морфологического изменения ядерной ламины с применением подхода, описанным нами ранее [Kaissi et al., 2017], было показано, что наиболее сильнее выражены признаки старения клетки (одновременная фрагментация и блеббы, а также фрагментация ядра) в клеточных линиях BRCA1SP, CS6SP и CS7SP. Однако характерный «ободок» ядерной ламины, свидетельствующий о её истончении, наблюдался только в дермальных фибробластах пациентов с синдромом ускоренного старения Синдроме Коккейна. Исследование оптической плотности фермента SA-β-Gal показало, что наибольшее количество фермента демонстрировали клетки линии BRCA1SP.

Результаты работы показали, что некоторые признаки, характерные для клеточного старения, такие как накопления аберраций ядерной ламины и количество фермента SA-β-Gal можно увидеть в дермальных фибробластах пациентов из группы риска развития рака. Однако такая характеристика состояние ядерной ламины, как наличие «ободка» детектируется только у пациентов с ускоренным старением.

Работа поддержана Советом по грантам президента Российской Федерации МК-3638.2019.7.

Н.А. Обанина^{1,2}, С.Р. Ноговицина¹, Ю.С. Таскаева¹, Н.П. Бгатов¹

АУТОФАГИЯ В ЦИТОПЛАЗМЕ ФОТОРЕЦЕПТОРНЫХ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ГЛАУКОМЕ

¹ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

N.A. Obanina^{1,2}, S.R. Nogovitsina¹, Yu.S. Taskaeva¹, N.P. Bgatova¹

AUTOPHAGY IN THE CYTOPLASM OF PHOTORECEPTOR CELLS OF THE RETINA OF HUMAN EYE WITH GLAUCOMA

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

n.obanina@g.nsu.ru

Ведущее место в развитии слабозрения и слепоты во всем мире занимает глаукома. В научной литературе имеются данные о механизмах структурных изменениях

ганглиозных клеток сетчатки при глаукоме, развитие в них аутофагии и апоптоза, однако отсутствуют сведения об особенностях ультраструктурной перестройки фоторецепторных клеток.

Целью исследования была оценка ультраструктурных изменений в цитоплазме фоторецепторных клеток сетчатки глаза человека при глаукоме.

Объектом исследования были фрагменты сетчатки энуклеированных по медицинским показаниям глаз пациентов с терминальной стадией глаукомы Новосибирского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова». Все исследования были проведены с разрешения биоэтического комитета и письменного информированного согласия пациентов на исследование биологического материала. Фрагменты сетчатки обрабатывали стандартным методом для изучения в электронном микроскопе. Морфометрию фоторецепторов проводили при увеличении $\times 25000$ с использованием компьютерной программы ImageJ.

В наружных сегментах дендритов палочковых нейронов отмечали набухание мембранных дисков и их дезорганизацию. В их эллипсоидах отмечали набухание митохондрий, их объемная плотность составляла 4%. Объемная плотность митохондрий с нарушением структуры крист равнялась 20%. Наблюдали аутофагосомы с митохондриями (4,5%).

В наружных сегментах дендритов колбочковых нейронов мембранные полудиски располагались более упорядоченно, в их эллипсоидах не наблюдали набухания митохондрий, отмечали единичные аутофагосомы (0,6%).

Выводы. Выявлена большая степень повреждения структуры и развития аутофагии в палочковых нейронах, чем в колбочковых. Аутофагия может играть двойственную роль в нейронах сетчатки, с одной стороны способствовать выживанию клеток путем удаления поврежденных структур, а с другой стороны запускать апоптоз, что требует дальнейших исследований.

Работа выполнена в рамках договора о научном сотрудничестве с МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Минздрава России, Новосибирский филиал.

Е.А. Орлова^{1,2}, А.В. Жолудева^{1,2}, М.Е. Ломакина^{2,3}, А. Полесская³, А. Готро³, А.Ю. Александрова²

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА ANKS1A НА ПОДВИЖНОСТЬ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

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

² ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

³ CNRS 7654, Ecole Polytechnique, Palaiseau, France

E. Orlova^{1,2}, A. Zholudeva^{1,2}, M. Lomakina^{2,3}, A. Poleskaya³, A. Gautreau³, A. Alexandrova²

THE EFFECT OF THE EXPRESSION OF ANKS1A PROTEIN ON THE MOTILITY OF NORMAL AND TUMOR CELLS

¹ Biological Department, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² N.N. Blokhin Cancer Research Center of Ministry of Health, Moscow, Russia

³ CNRS 7654, Ecole Polytechnique, Palaiseau, France

evg19111976@yandex.ru

Миграции опухолевых клеток по мезенхимальному механизму происходит за счет формирования ламеллиподии и регулируется сигнальным путем Ras-WAVE-Arp2/3, отвечающим за полимеризацию сети актиновых филаментов. Недавно описан новый эффектор Ras, белок Anks1a, для которого не было установлено определенной функции в нормальных клетках. Показано, что Anks1a оказывает влияние на миграцию опухолевых клеток, возможно, за счет усиления интенсивности обмена рецепторов к эпидермальному фактору роста (EGF) ErbB2 на поверхности опухолевых клеток. Экспрессия Anks1a повышена во многих опухолевых клетках, гиперэкспрессия Anks1a в клетках немелкоклеточного рака легких ассоциирована с более продвинутой стадией заболевания. Задачей исследования было выяснение вопроса, влияет ли Anks1a на подвижность нормальных и опухолевых клеток и каков механизм его действия.

Были использованы три линии клеток: MCF-10A — условно нормальные клетки молочной железы; MDA-MB-231 — трижды негативная аденокарцинома молочной железы человека (нет экспрессии HER2/ErbB2 рецептора); SK-BR-3 — аденокарцинома молочной железы человека (рецептор ErbB2 амплифицирован). Экспрессию белка Anks1a подавляли с помощью трансфекции малыми интерферирующими РНК. Для выявления изменений актинового цитоскелета и миграционных характеристик клеток использовали иммунофлуоресцентное окрашивание и прижизненную видеомикроскопию.

Эффект подавления экспрессии Anks1a различается в клетках, несущих рецепторы к EGF и нет. Так, супрессия белка Anks1a в клетках, в которых есть рецептор ErbB2 (MCF-10A и SK-BR-3) приводит к подавлению стимулирующего действия EGF на миграцию и пролиферацию клеток. Однако в клетках, в которых данный рецептор отсутствует (MDA-MB-231), подавление Anks1a вызывает увеличение степени расплывания клеток на субстрате, увеличение их псевдоподиальной активности и изменение характера их движения. В целом эти изменения сходны с теми, которые вызываются активацией малой ГТФазы Ras1, т.е. в клетках, где нет рецептора к EGF, Anks1a действует как антагонист Ras.

Полученные результаты указывают на то, что Anks1a действительно оказывает влияние на миграционные способности клеток через сигнальный путь, регулируемый EGF. Но в тех клетках, где отсутствует рецептор к EGF, супрессия Anks1a также влияет на клеточную подвижность (меняются расплывание, пролиферация, изменение краевой активности клеток). Это связано с участием Anks1a в сигнальных путях, регулируемых малой ГТФазой Ras. Уточнение молекулярных механизмов действия Anks1a требует дальнейших исследований, как и анализ перспективности использования белка Anks1a в качестве прогностического фактора или объекта для терапевтического воздействия при лечении опухолей.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-54-16006 НЦНИЛ_а.

М.Н. Парыгина

БЕЛОК CDX2 КАК ВЕДУЩИЙ МАРКЕР АТРОФИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА

Омский государственный медицинский университет,
Омск, Россия

M.N. Parygina

CDX2 AS A LEADING MARKER OF GASTRIC MUCOSAL ATROPHY

Omsk state medical university, Omsk, Russia

mariyakern@gmail.com

Оценка атрофии слизистой оболочки желудка (СОЖ) является мерой стратификации риска развития рака желудка кишечного типа. Выделяют два варианта атрофии: абсолютную (уменьшение числа желез) и метапластическую (изменение типа эпителия). Верификация второго варианта более воспроизводима за счёт того, что основывается на обнаружении специфического морфологического феномена. Возможным способом детекции участков метапластической атрофии / кишечной метаплазии (КМ) выступает применение иммуногистохимического (ИГХ) маркера кишечной дифференцировки CDX-2 [1].

Цель работы — определить воспроизводимость оценки экспрессии белка CDX-2 как маркера атрофии СОЖ.

В исследовании включили 125 биоптатов СОЖ с наличием КМ, исследованных гистологическим и ИГХ методом. Использовали антитела CDX-2, клон EPR2764Y (Cell Marque, США). При подсчете экспрессии CDX-2 учитывали интенсивность диффузного ядерного окрашивания: отсутствует — 0, слабое/умеренное — 1 или выраженное — 2. Анализ согласованности заключения о наличии и выраженности КМ проводили путем оценки критерия согласия к Козна.

Очаги полной КМ присутствовали во всех фрагментах (125 биоптатов (100%)), неполной КМ — в 49 биоптатах (39,2%). Экспрессию CDX-2 отмечали во всех эпителиоцитах. Очаги полной КМ характеризовались выраженным (2) диффузным окрашиванием ядер, в зонах неполной КМ метки имели умеренную интенсивность (1) в 47 из 49 биоптатов и выраженную (2) — в 2 из 49 биоптатов. CDX-2 позитивные метки слабой интенсивности обнаруживали за пределами гистологически определяемых участков КМ в цилиндрических клетках желудочного фенотипа, преимущественно — в зоне перешейка желез и покровно-ямочного эпителия. При формировании серии срезов в таких участках в 42 из 56 биоптатов была обнаружена очаговая полная КМ. При оценке выраженности КМ в гистологических препаратах, окрашенных г/э, и ИГХ препаратах показатель межисследовательского согласия составил 0,83 и 0,98, соответственно (значительный уровень согласия).

КМ является хорошо воспроизводимым морфологическим феноменом. Основным диагностическим ИГХ маркером КМ является CDX-2. Наличие экспрессии CDX-2 в желудочном эпителии может рассматриваться как суррогатный маркер КМ.

Литература:

1. Nakayama C. et al. Transduced caudal-type homeobox (CDX) 2/CDX1 can induce growth inhibition on CDX-deficient gastric cancer by rapid intestinal differentiation. *Cancer Sci.* 2018; 109(12): 3853–64.

Д.В. Пономарев¹, Е.С. Савина¹, О.Г. Запарина¹
ВНЕКЛЕТочНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ ОПИСТОРХОЗА ТРЕМАТОДЫ *OPISTHORCHIS FELINEUS* УВЕЛИЧИВАЮТ СКОРОСТЬ МИГРАЦИИ И ПРОЛИФЕРАЦИИ ХОЛАНГИОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА Н69

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

D.V. Ponomarev¹, E.S. Savina¹, O.G. Zaparina¹
OPISTHORCHIS FELINEUS EXTRACELLULAR VESICLES INCREASE RATE OF MIGRATION AND PROLIFERATION OF HUMAN H69 CHOLANGIOCYTES

¹ The Federal Research Center of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

p.dmitr@outlook.com

Возбудитель описторхоза *Opisthorchis felineus* паразитирует в гепатобилиарной системе рыбоядных млекопитающих и вызывает формирование очагов хронического воспаления в печени, неоплазию эпителия желчных протоков. Хронический описторхоз может стать причиной холангиокарциномы, рака желчевыводящих путей. Есть гипотеза, что механизм холангиокарциногенеза связан с воздействием внеклеточных везикул *O. felineus*, эффект которых до сих пор не исследован. Целью исследования было изучить влияние секретируемого продукта взрослых особей *O. felineus* на показатели пролиферации и миграции иммортализованной клеточной линии холангиоцитов человека Н69. Взрослых особей выделяли из желчных протоков печени хомяков *Mesocricetus auratus*, инфицированных *O. felineus*. Клетки Н69 культивировали без прямого контакта с 1–6 взрослыми особями в обедненной среде. Скорость клеточной миграции оценивали при помощи теста на заживление раны. В качестве контроля были взяты опухолевые клетки печени человека HepG2. В отличие от HepG2, при бесконтактном сокультивировании было показано увеличение скорости пролиферации клеток Н69 от 4 до 17 раз, что сопровождалось также морфологическими изменениями клеток и увеличением скорости миграции в 2 раза, а также изменением типа миграции на индивидуальный характер. Внеклеточные везикулы взрослых особей описторхов были получены методом ультрафильтрации сред. Эффект везикул на пролиферацию и миграцию клеток Н69 был аналогичен эффекту от сокультивирования со взрослыми особями. В отличие от холангиоцитов, влияние на клетки HepG2 оказалось несущественным. Таким образом, впервые показан выраженный специфический митогенный эффект внеклеточных везикул трематоды *O. felineus* на холангиоциты человека Н69, а также на изменение их скорости и характера миграции. Показанные изменения пролиферации и миграции холангиоцитов *in vitro* могут отражать неоплазию холангиоцитов *in vivo*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-15-00098.

А.Д. Поспелов¹, Е.И. Черкасова¹,
Л.Б. Тимофеева^{1,2}, И.В. Балалаева¹

ПОЛУЧЕНИЕ БЕСКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЫХ МАТРИКСОВ И ИХ РЕПОПУЛЯЦИЯ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ

¹ Университет Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

² Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

A.D. Pospelov¹, E.I. Cherkasova¹,
L.B. Timofeeva^{1,2}, I.V. Balalaeva¹

OBTAINING OF ACELLULAR ORGAN MATRICES AND THEIR REPOPULATION WITH TUMOR CELLS

¹ Lobachevsky State University, Nizhny Novgorod, Russia

² Volga Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

eso103163@gmail.com

Получение бесклеточных органных матрикс, или децеллюляризация, представляет собой обработку натуральных тканей или органов с удалением всех клеточных элементов и максимальным сохранением состава и структуры внеклеточного матрикса. Такие децеллюляризованные (ДЦЛ) матриксы могут быть использованы в экспериментальной онкологии для репопуляции опухолевыми клетками и исследования роли неклеточного компонента стромы в развитии опухоли и метастазировании.

Целью нашей работы являлось изучение возможностей получения ДЦЛ матриксов, а также оценка их способности к репопуляции. В качестве объектов были использованы органы мыши: почки, печень, лёгкие, селезёнка, яичники, кожа.

На основании экспериментального сравнения был выбран метод химической децеллюляризации, признанный компромиссным по таким характеристикам как целостность архитектоники, скорость децеллюляризации и простота относительно других способов. Органы животных последовательно выдерживались в растворах Тритона X-100, SDS и SDC. В ходе децеллюляризации наблюдали постепенную потерю окраски органа, а также помутнение децеллюляризирующего раствора, что свидетельствует о вымывании клеточного компонента. Итоговые матриксы, сохраняя свою структуру, становились почти прозрачными или беловатыми слабо-мутными.

Для оценки пригодности полученных матриксов была проведена их репопуляция сокультурой эпидермоидной карциномы человека линии A431 и фибробластов человека линии VJ-5ta. После инкубации каждый матрикс был подвергнут стандартной гистологической проводке с последующей окраской гематоксилин-эозином с целью оценки сохранности архитектоники матрикса, а также была произведена количественная оценка содержания ДНК до и после рецеллюляризации.

По результатам работы была показана достоверная элиминация клеток из матриксов органов с сохранением его архитектоники. После рецеллюляризации было выявлено различие в морфологических характеристиках опухолевых клеток, находящихся на поверхности и внутри матрикса. Мы предполагаем, что в дальнейшем ДЦЛ и РЦЛ матриксы могут быть использованы для исследования особенностей опухоль-матриксного взаимодействия, а также процессов метастазирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант 19-74-20168).

Д.М. Поташникова¹, М.А. Тихомирова²,
А.А. Саидова¹

РОЛЬ TAT-БЕЛКА В ЗАЩИТЕ ОТ АПОПТОЗА В КУЛЬТУРЕ В-ЛИМФОЦИТОВ RPMI8866

¹ Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

D.M. Potashnikova¹, M.A. Tikhomirova²,
A.A. Saidova¹

THE ROLE OF TAT-PROTEIN IN APOPTOSIS PROTECTION OF RPMI8866 B-LYMPHOCYTES

¹ Cell biology and histology department, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

dariapotashnikova@yandex.ru

В-зрелоклеточные лимфомы могут развиваться как побочное заболевание при ВИЧ и являются частой причиной смерти ВИЧ-инфицированных пациентов. Предполагаемым ВИЧ-ассоциированным индуктором онкогенеза является вирусный (14 кДа) Tat-белок (trans-activator of transcription): некоторые данные указывают на его способность вызывать гиперэкспрессию генов антиапоптотических белков, однако это свойство никогда не ассоциировалось с В-клеточным лимфомагенезом. В данной работе для культуры В-лимфоцитов RPMI8866-Tat-GFP (с постоянной экспрессией Tat) была показана гиперэкспрессия транскрипционного фактора NFκB (IKKα/β, p65, NFκB1/2), одного из универсальных сигнальных эффекторов, обеспечивающих выживание В-клеток, по сравнению с исходной культурой RPMI8866. Для данных клеточных линий была описана модель одновременного анализа клеточного цикла и апоптоза под действием классических митостатиков (ингибиторов микротрубочек с разным механизмом действия: паклитаксела, винорельбина и нокадазола). Было показано, что митостатический ответ клеток является нелинейным (существуют пороговые концентрации митостатиков, обеспечивающие эффективное накопление клеток в фазе G2/M) и одинаковым для обеих клеточных линий. Пороговые концентрации составили 10 нМ для паклитаксела и винорельбина и 100 нМ для нокадазола. Арестованные в G2/M-фазе клетки при этом погибали апоптозом. Однако, начиная с пороговой митостатической и до максимальной использованной (1000 нМ) концентрации каждого из веществ, процент апоптотических клеток возрастал линейно и был достоверно меньше в клетках RPMI8866-Tat-GFP по сравнению с RPMI8866 (p<0.05) вне зависимости от концентрации веществ и способа оценки процента апоптотических клеток. Полученные данные позволяют предположить несколько путей индукции апоптоза при воздействии ингибиторов микротрубочек, связанных и несвязанных с митотическим арестом, а также роль Tat-белка в защите от апоптоза через повышение уровня NFκB в В-лимфоцитах.

Работа поддержана грантом РФФ № 18-75-00033.

Н.Г. Преснухина¹, В.И. Першин^{1,2*},
Н.С. Максимова¹, О.М. Широкова¹,
О.Г. Заборская^{1,2}, Т.Ф. Ковалева¹,
И.А. Медяник¹, И.В. Мухина^{1,2}

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ ИЗ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ГЛИОМЫ ЧЕЛОВЕКА

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Н. Новгород, Россия

² Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, Россия

N.G. Presnukhina¹, V.I. Pershin^{1,2*}, N.S. Maksimova¹,
O.M. Shirokova¹, O.G. Zaborskaya^{1,2},
T.F. Kovaleva¹, I.A. Medynik¹, I.V. Mukhina^{1,2}

COMPARISON METHODS FOR EXOSOME ISOLATION FROM PRIMARY HUMAN GLIOMA CULTURES

¹ Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

² Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

bp1995@yandex.ru

Глиомы относят к распространенным и агрессивным опухолям головного мозга. Стандартные методы лечения, включающие резекцию опухоли, ионизирующее излучение и химиотерапию, не исключают рецидивы. Это объясняется как особенностями локализации, так и высокой гетерогенностью опухоли и резистентностью к терапии. В настоящее время одним из важных звеньев злокачественного процесса считают изменение экспрессии микроРНК, которые транспортируются, в том числе и в составе микровезикул. Однако эффективность использования экзосом и их компонентов в клинической практике в качестве онкомаркеров прежде всего зависит от методов выделения микровезикул.

Задачи исследования: сравнение методов выделения экзосом из культуральной среды и плазмы крови пациентов с глиомой.

Объект и методы исследования: плазма крови и материал операционной биопсии пациентов со злокачественными опухолями головного мозга (grade II-IV), диагноз верифицировался по результатам МРТ, патоморфологического исследования, иммуногистохимии. Культивирование проводили в условиях инкубатора (5% CO₂, 37 °C) в среде DMEM/F12 с добавлением фетальной бычьей сыворотки без экзосом (Fetal Bovine Serum exosome-depleted; Thermo Fisher) и в среде DMEM/F12, обогащенной FGF2, EGF и B27. Экзосомы выделяли методами дифференциального центрифугирования в Exosome Isolation Kit (Invitrogen) и магнитной сепарации (Miltenyi Biotec). Верификацию выделяемых экзосом проводили методом просвечивающей электронной микроскопии и вестерн-блотт анализа маркера CD63.

Результаты исследования: культивирование опухолевых клеток в DMEM/F12 с добавлением бычьей сыворотки приводит к дифференциации клеток опухоли, потенциальной потере пролиферативных и туморогенных свойств, что может исказить состав экзосом. Культивирование в среде, обогащенной FGF2, EGF и B27, сохраняет способность опухолевых клеток к продолжительному делению, способствует формированию глиосфер, способных образовывать новые колонии при пересеве. Оптимальный срок культивирования диссоциированных клеток глиомы для выделения экзосом

составляет не менее 3 дней, при сокращении срока культивирования наблюдается неспецифический сигнал на вестерн-блоте, характерный для плазмы крови, полученной от тех же пациентов, исчезающий при более длительном культивировании. Выделение экзосом с помощью Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen) требует дополнительной очистки проб от сопутствующих липопротеинов, что снижает концентрацию экзосом в пробе. Эффективность и селективность выделения микровезикул с помощью магнитной сепарации (Miltenyi Biotec) значительно выше: интенсивность сигнала на блоте различается в 5 раз.

Работа поддержана внутренним грантом ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России.

П.В. Пчелин^{1,2}, М.А. Коротыш³, Т.Ф. Ковалёва²,
С.В. Копишинская², И.В. Мухина^{1,2}

МИТОХОНДРИАЛЬНОЕ ДЫХАНИЕ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГЕНТИНГТОНА ИЗМЕНЯЕТСЯ ДО МАНИФЕСТАЦИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

¹ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

² Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

³ Медико-генетический центр «Геном», Нижний Новгород, Россия

P.V. Pchelin^{1,2}, M.A. Korotysh³, T.F. Kovaleva²,
S.V. Kopishinskaya², I.V. Mukhina^{1,2}

MITOCHONDRIAL RESPIRATION IN SKELETAL MUSCLES OF PATIENTS WITH HUNTINGTON'S DISEASE CHANGES BEFORE MANIFESTATION

¹ Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

² Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

³ Medical Genetics Center "Genom", Nizhny Novgorod, Russia

ptch.pv@gmail.com

Болезнь Гентингтона (БГ) — наследуемое аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, связанное с экспрессией мутантного белка гентингтина в головном мозге и периферических тканях. Развитие БГ сопряжено с селективной гибелью нейронов стриатума и других отделов мозга, что приводит к появлению хореического гиперкинеза, нарушению поведения и когнитивных функций [1]. Ряд исследований указывает на связь развития БГ с патологическими процессами, протекающими не только в мозге, но и в скелетных мышцах, в частности, с атрофией мышц и нарушением биоэнергетики митохондрий [2]. Поэтому поиск митохондриальных изменений, которые могут служить потенциальным биомаркером появления и прогрессирования метаболических нарушений при БГ, является актуальным.

Цель исследования: выявить изменения в динамике дыхания митохондрий в скелетных мышцах пациентов с преманифестной и манифестной стадиями болезни Гентингтона.

Объект исследования: образец биопсии мышечной ткани (в среднем 5–6 мг) латеральной широкой

мышцы бедра пациентов с преманифестной и манифестной стадиями БГ. После разделения и пермеабиллизации мышечных волокон осуществлялась оценка величины митохондриального дыхания с применением метода флюоресцентной высокоразрешающей респирометрии (респирометр Oxgraph-2k, Oroboros Instruments, Австрия).

Было обследовано 32 пациента: по 8 пациентов с преманифестной и манифестной стадиями БГ, соответственно, и по 8 человек в группах контроля, подобранных по полу и возрасту. У пациентов с преманифестной стадией БГ в сравнении со здоровым контролем отмечено достоверное снижение интенсивности митохондриального дыхания скелетных мышц при окислительном фосфорилировании (комплекс I, на 25%; комплексы I+II, на 25%), снижение коэффициента дыхательного контроля (степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования) (комплекс I, на 31%), уменьшение показателя емкости цепи переноса электронов (комплексы I+II, на 19%). Напротив, у пациентов с манифестной стадией БГ указанные показатели митохондриального дыхания не отличались от контроля.

Таким образом, выявленные характерные изменения митохондриального дыхания скелетных мышц пациентов с преманифестной стадией болезни Гентингтона свидетельствуют о вовлечении митохондриального аппарата не только нервных клеток, но и скелетной мускулатуры в патофизиологический механизм развития данного заболевания.

Исследование проведено при финансовой поддержке Минздрава России, рег. № 115061110020.

Литература:

1. Ghosh R., Tabrizi S. Huntington disease. Handbook of Clinical Neurology. 2018; 255–78.
2. Zielonka D., Piotrowska I., Marcinkowski J. et al. Skeletal muscle pathology in Huntington's disease. Front. Physiol. 2014; 5: 380.

А.А. Романова, А. Сагайдак, Т.А. Григорьева, Е.А. Чернявская, М.Ю. Львова, В.Г. Трибулович

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ПОЛУЧЕНИЯ СУММАРНОЙ РНК КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НСТ116 ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербург, Россия

A.A. Romanova, A. Sagaidak, T.A. Grigoreva, E.A. Chernyavskaya, M.Yu. Lvova, V.G. Tribulovich

OPTIMIZATION OF HCT116 TOTAL RNA ISOLATION PROTOCOL FOR REAL-TIME RT-PCR

Saint-Petersburg State Institute of Technology (Technical University), laboratory of Molecular pharmacology, Saint-Petersburg, Russia

agurangelina@mail.ru

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) является широко применяемым методом молекулярной биологии для амплификации определённых фрагментов нуклеиновых кислот. Однако для получения достоверных и воспроизводимых данных необходимо провести оптимизацию

всех параметров анализа, начиная с первого этапа — процесса получения исследуемой РНК-матрицы [1].

Качество выделенной РНК является одним из важнейших параметров, оказывающих влияние на результаты ПЦР. Для получения суммарной РНК из клеток НСТ116 (клеточная линия рака толстой кишки человека) использовали 4 коммерческих набора для выделения: TRIzol™ (Invitrogen), ExtractRNA™ (Евроген), PureLink™ RNA mini kit (Ambion) и PureLink™ RNA mini kit с использованием TRIzol™.

Для проверки чистоты полученной РНК-матрицы (от примесей белков и компонентов веществ, используемых для выделения) измеряли оптическую плотность образцов, устанавливали соотношение A260/280 и A260/230. Целостность и качество РНК определяли по соотношению интенсивности полос рРНК 28S/18S в 1% агарозном геле. Воспроизводимость результатов оценивали путём последовательного проведения трёх независимых экспериментов в трёх повторностях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-13-10358).

Литература:

1. Nolan T., Hands R., Bustin S. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc 2006; 1: 1559–1582.

Д.Д. Ромашин¹, М.Н. Карагяур^{2,3}, Н.Г. Лузгина¹, А.Л. Русанов¹.

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ НОРМАЛЬНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ НАСАТ С НОКДАУНОМ ГЕНА TP53

¹ *Институт Биомедицинской Химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия*

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

³ *Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова*

D.D. Romashin¹, M.N. Karagyaour^{2,3}, N.G. Luzgina¹, A.L. Rusanov¹.

A NOVEL CELLULAR MODEL BASED ON HACAT KERATINOCYTES WITH KNOCKDOWN OF TP53

¹ *V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia*

² *Lomonosov Moscow State University, Institute of Regenerative Medicine, Moscow, Russia*

³ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, Moscow, Russia*

daniil.romashin@gmail.com

Нарушения терминальной дифференцировки кератиноцитов являются причиной ряда заболеваний, таких как псориаз и atopический дерматит. Протекание этих заболеваний характеризуется появлением областей эпидермиса, в которых кератиноциты избыточно пролиферируют при сниженной способности к дифференцировке. Есть основания полагать, что молекулярные механизмы, лежащие в основе данных заболеваний, могут быть связаны с биологией белков семейства p53. Белок p53 кодируется геном TP53 и является одним из ключевых регуляторов апоптоза и пролиферации. Контролирующая функция

p53 реализуется посредством широкой сети молекулярных механизмов; белок p53 является эффектором порядка 350 генов [1], отвечающих за программируемую клеточную гибель, клеточное старение, репарацию ДНК. Важнейшей биологической функцией гена *TP53* является сохранение постоянства генома за счет элиминации клеток, подверженных генотоксическому стрессу, и стареющих клеток. Появляются данные об участии данного белка в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки кератиноцитов в норме и при патологии.

Целью данной работы являлась разработка клеточной модели со сниженной экспрессией гена *TP53* на основе нормальных кератиноцитов человека линии HaCat. В ходе работы был разработан воспроизводимый протокол нокдауна гена *TP53* с помощью малых РНК, образующих шпильки (shRNA), которые доставлялись в клетки в составе генетических конструкций на основе лентивирусных частиц. Для отбора клеток с нокдауном *TP53* использовали селекцию на пурамицине. Нокдаун целевого гена верифицировали с помощью ПЦР-РВ. Полученная в ходе работы клеточная модель может быть использована для исследования влияния белка p53 на физиологию кератиноцитов и связей p53 с другими регуляторами жизнедеятельности клетки, а также изучения роли данного гена в патогенезе заболеваний кожи, сопровождающихся нарушениями процесса кератинизации.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы.

Литература:

1. Fischer, M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*. 2017; 36(28): 3943–3956.

**Т.С. Салль, Е.С. Щербаклова,
Е.В. Демьянова, Т.Я. Вахитов**

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИТОВ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ НА КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖКТ

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

**T.S. Sall, E.S. Shcherbakova,
E.V. Demyanova, T. Ya. Vakhitov**

INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE GUT MICROBIOTA METABOLITES ON THE CELLULAR MODELS OF THE GASTROINTESTINAL DISEASE

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, Russia

t.s.sall@hpb.spb.ru

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) лидирует среди заболеваний печени и характеризуется накоплением триглицеридов (ТГ) в гепатоцитах и развитием воспаления. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) являются тяжелыми патологиями ЖКТ и характеризуются нарушением барьерной функции кишечника и воспалением слизистой оболочки. Общим для этих двух патологий является этиологический фактор — дисбиоз

кишечной микробиоты. Изменение состава или функциональной активности кишечной микробиоты приводит к изменению содержания продуктов микробного происхождения. Повышение проницаемости кишечника способствует их попаданию в кровоток и через воротную вену — в печень, где они могут выступать в качестве источников энергии или оказывать регуляторное действие.

Цель: исследовать биологическую активность метаболитов кишечной микробиоты на клеточных моделях НАЖБП и ВЗК.

Модель НАЖБП *in vitro* была получена путем воздействия на клетки гепатокарциномы HepG2 пальмитиновой и олеиновой кислотами, что приводило к повышению уровня ТГ и провоспалительного цитокина ИЛ-8. Для создания модели ВЗК на клетки кишечного эпителия CaCo-2 воздействовали ИЛ-1b, что приводило к увеличению продукции клетками ИЛ-8 и повышению проницаемости монослоя.

С помощью данных моделей оценивали влияние микробных метаболитов на липогенез и воспаление в гепатоцитах и барьерные свойства кишечного эпителия и воспаление в энтероцитах.

Было протестировано 35 синтетических аналогов метаболитов кишечной микробиоты в концентрациях 10–10000 мкМ. Из них были выделены метаболиты, снижающие накопление ТГ и уровень воспаления (3-индолпропионовая, валериановая кислоты, глицин, лейцин, изолейцин) и повышающие эти показатели (янтарная, изо-валериановая, фенилкарбоновые кислоты, валин) в модели НАЖБП. На модели ВЗК были выявлены метаболиты, снижающие воспаление и улучшающие барьерные свойства кишечного эпителия (пропионовая, индолакриловая кислоты, индол). Таким образом, нами была выявлена биологическая активность микробных метаболитов в отношении заболеваний ЖКТ, что открывает перспективы для разработки препаратов (метабиотиков) для их лечения.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ № МК-2429.2020.4.

О.О. Сербина^{1,2}, Е.В. Киселева^{1,2}, Е.С. Васецкий^{1,3} РОЛЬ КЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В РАЗВИТИИ ФИБРОЗА ПРИ ЛЛПМД

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

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

³ *Онкологический институт Гюстав Русси, Вильжюиф, Франция*

О.О. Serbina^{1,2}, E.V. Kiseleva^{1,2}, Y.S. Vassetzky^{1,3} THE ROLE OF CELL INTERACTIONS IN THE FIBROSIS DEVELOPMENT IN FSHD

¹ *Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia*

² *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

³ *Institut de Cancerologie Gustave Roussy, Villejuif, France*

olatyeva94@gmail.com

Лице-лопаточно-плечевая миодистрофия (ЛЛПМД) — аутосомно-доминантное расстройство, характеризующееся прогрессирующим ослаблением скелетных мышц. В ходе развития заболевания происходит дегенерация

мышечной ткани с последующим фиброзом. ЛЛПМД связана с aberrантной экспрессией *DUX4*, закодированного в массиве D4Z4 (Chr. 4q35). *DUX4* — транскрипционный фактор, который в норме не экспрессируется во взрослых соматических тканях. Ранее показано, что экспрессия *DUX4* в миобластах индуцировала экспрессию воспалительных цитокинов, включая CXCL12 и рецептор к нему CXCR4. Исследования мышечных дистрофий в основном сфокусированы на выяснении молекулярно-генетических механизмов развития патологии, в то время как клеточные взаимодействия в пораженных мышцах не были детально изучены.

Мы исследовали взаимодействия миобластов (МБ) и МСК и их роль в развитии фиброза на *in vitro* модели ЛЛПМД. Показали, что МСК активнее мигрировали в направлении МБ со сверхэкспрессией *DUX4* по сравнению с контрольной группой. Мы предполагаем, что *DUX4* контролирует миграцию МСК через CXCL12-CXCR4 ось, так как нейтрализация CXCL12 или ингибирование CXCR4 снижали миграцию МСК. Факторы МБ от пациентов с ЛЛПМД стимулируют пролиферацию МСК. Возможно, МСК в очаге воспаления не способствуют восстановлению поврежденных мышц, а провоцируют фиброз. Мы показали, что в условиях воспаления ЛЛПМД-МБ стимулируют увеличение уровня синтеза и секреции коллагена клетками МСК. В свою очередь МСК препятствуют дифференцировке МБ в условиях прямого сокультивирования, оказывая наибольшее влияние на ЛЛПМД-МБ. Мы показали, что секретируемые МСК факторы увеличивают уровень синтеза и секреции VEGF в МБ от здоровых доноров (в 5 и 14 раз соответственно) и не влияют на эти показатели в МБ от больных доноров.

Таким образом, под влиянием миобластов МСК пролиферируют и увеличивают продукцию коллагена. МСК ингибируют миогенную дифференцировку. Миобласты под влиянием МСК увеличивают выработку факторов ангиогенеза. Такое взаимное влияние, вероятно, может играть роль в развитии фиброза и реорганизации внеклеточного матрикса.

Работа проводится в рамках темы Государственного задания ИБР РАН и Программы президиума РАН

А.Ю. Сидоров^{1,2}, Т.В. Храмова^{1,2}, Л.В. Бедулева^{1,2},
И.В. Меньшиков^{1,2}, А.С. Терентьев^{1,2},
Л.У. Гильманова¹, А.Н. Горбушина¹

СТРУКТУРА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИММУНОСУПРЕССИВНЫХ FC ФРАГМЕНТОВ IGG

¹ ФГБОУ ВО Удмуртский государственный
университет, Ижевск, Россия

² Удмуртский федеральный исследовательский
центр УрО РАН, Ижевск, Россия

A. Sidorov^{1,2}, T. Khramova^{1,2}, L. Beduleva^{1,2},
I. Menshikov^{1,2}, A. Terentiev^{1,2},
L. Gilmanova¹, A. Gorbushina¹

STRUCTURE AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF IMMUNOSUPPRESSIVE IGG FC FRAGMENTS

¹ Udmurt State University, Izhevsk, Russian Federation

² Udmurt Federal Research Center, Ural Branch of the
Russian Academy of Sciences, Izhevsk, Russian
Federation

khrratat@mail.ru

Ранее мы показали, что устойчивость к развитию экспериментально-вызванных аутоиммунных заболеваний ассоциирована с продукцией ревматоидного фактора, выявляемого методом агглютинации танизированных нагруженных IgG эритроцитов. Чтобы отличать данный ревматоидный фактор от классического ревматоидного фактора, продукция которого служит маркером ревматоидного артрита, мы назвали выявленный нами ревматоидным фактор регуляторным (регРФ). Было обнаружено, что иммунизация Fc фрагментами IgG, экспонирующими эпитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, редуцирует симптомы коллаген-индуцированного артрита крыс. Следовательно, лимфоциты, продуцирующие регРФ является потенциальной терапевтической биомишенью, а Fc фрагменты IgG могут быть эффективным средством ее стимуляции и лечения ревматоидного артрита. Целью исследования было выяснить структуру Fc фрагментов IgG человека и крысы, несущих эпитопы, распознаваемые регРФ. Обнаружено, что приобретение Fc фрагментами IgG человека эпитопов специфичных к регРФ ассоциировано с восстановлением дисульфидных связей шарнирной области и конформационными изменениями доменов Fc фрагментов, о которых свидетельствует увеличение оптической доступности ароматических аминокислот. Fc фрагменты IgG крысы, несущие эпитопы специфичные к регРФ состоят из цепей разной длины, одна из которых несет на 1 или 2 SH группы больше, чем другая. Fc фрагменты IgG крысы подвергаются спонтанной реконфигурации, в ходе которой образуются Fc фрагменты, состоящие из одинаковых по длине цепей, несущих одинаковое количество SH групп в шарнире. Fc фрагменты IgG крысы, несущие неэпитопы, склонны к агрегации. Агрегация не ведет к потере эпитопов, специфичных к регРФ, но способность Fc фрагментов крысы индуцировать продукцию регРФ в организме при этом утрачивается.

Работа поддержана Стипендией Президента Российской Федерации № СП-1630.2018.4. Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ (проект номер 0827-2020-0012, государственное задание номер 075-00232-20-01).

М.Ю. Сироткина^{1,2}, Д.М. Дарвиш¹, Ю.А. Нащечкина¹
**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ
НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ КОЛЛАГЕНОВЫХ
ПЛЕНКАХ**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

M.Y. Sirotkina^{1,2}, D.M. Darvish¹, Y.A. Nashchekina¹
**CULTIVATION OF CORNEAL CELLS
ON MODIFIED COLLAGEN FILMS**

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State Institute of Technology, Saint
Petersburg, Russia

ms778321@gmail.com

Согласно данным ВОЗ на 2017 год в мире насчитывается около 36 миллионов людей, страдающих от слепоты. Одной из ведущих причин инвалидности по зрению является заболевание роговицы. Для эффективного лечения часто требуется пересадка кадаверной роговицы,

однако остро стоит проблема дефицита донорского материала.

В последние годы активно идет разработка ткане-инженерных конструкций с применением природных полимеров. Матрицы на основе коллагена I типа рассматриваются в качестве трансплантата для замещения пораженной стромы роговицы, а также носителя терапевтических клеток. Такие матрицы отличаются высокой биосовместимостью и слабой антигенностью, но при этом они имеют низкую прочность и высокую скорость биodeградации. Для улучшения характеристик матриц, их обрабатывают химическими сшивающими агентами, которые образуют ковалентные связи между полипептидными цепями коллагена.

В большинстве случаев патология роговицы сопровождается повреждением эпителиального слоя. Восстановлению эпителия способствует лучшая адгезия и пролиферация терапевтических клеток. Модификация матриц коллагеном IV типа, основным компонентом базальных мембран, предположительно будет способствовать этим процессам.

Целью данной работы является получение коллагенов I и IV типов и формирование на их основе сшитых и композитных матриц для культивирования клеток роговицы.

Коллаген I типа выделяли из сухожилий крысиных хвостов методом кислой экстракции. Коллаген IV типа получали из плаценты человека методом ферментативной экстракции. Выделенные белки охарактеризовали методом электрофореза. На основании полученных материалов методом полива формировали матрицы в виде пленок. Пленки на основе коллагена I типа сшивали карбодимидным методом.

Исследовали скорость деградации пленок, в зависимости от концентрации сшивающего агента под действием фермента коллагеназы. Было показано, что присутствие сшивающего агента снижает скорость деградации пленок. Также исследовали механические свойства пленок, обработанных различными концентрациями сшивающего агента. Показано, что сшивание приводит к повышению механической прочности пленок. Исследовали влияние состава композитных матриц и добавления сшивающего агента на морфологию и жизнеспособность клеток линии Statens Serum Institut Rabbit Cornea (SIRC).

Показано, что на пленках, модифицированных сшивающим агентом, происходит изменение пролиферативной активности клеток, а также их распластанности. Также показано, что наличие IV коллагена в композитных матрицах положительно влияет на адгезионную и пролиферативную активность клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20-03-00400_a).

Е.М. Согорина¹, Д.А. Мордовкина¹, И.С. Ильин², В.Б. Сулимов², Н.И. Моисеева³, Л.П. Овчинников¹

ВЛИЯНИЕ ГАЛОГЕНПРОИЗВОДНЫХ ТРИАЗОЛОХИНАЗОЛИН-8-ОНОВ НА ЛОКАЛИЗАЦИЮ БЕЛКА YB-1

¹ Институт белка РАН, Пущино, Россия

² Научно-исследовательский вычислительный центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

E.M. Sogorina¹, D.A. Mordovkina¹, I.S. Ilin², V.B. Sulimov², N.I. Moiseeva³, L.P. Ovchinnikov¹

THE IMPACT OF HALOGENATED TRIAZOLOQUINAZOLIN-8-ONES ON THE CELLULAR LOCALIZATION OF THE YB-1 PROTEIN

¹ Institute of protein research RAS, Pushchino, Russia

² Research Computing Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ FSBU "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health, Moscow, Russia

kategrigoreva@vega.protres.ru

YB-1 — многофункциональный белок, выполняющий свои функции в ядре и в цитоплазме [1]. Он переходит в ядро под воздействием различных стимулов. В литературе имеются данные о связи между ядерным накоплением YB-1 и прогрессированием опухоли и ее резистентностью к проводимой терапии. Последнее время интерес исследователей направлен на поиск малых молекул, которые бы связывали YB-1 и препятствовали его транслокации в ядро.

YB-1 состоит из трех доменов: AP-домена, домена холодного шока (CSD) и C-концевого домена. CSD белка YB-1 содержит в себе два регуляторных элемента: РНК-связывающие РНП-мотивы и серин 102 (S102). Субклеточная локализация белка YB-1 зависит как от связывания его с РНК, так и от фосфорилирования по S102. Методом молекулярного докинга нами были отобраны низкомолекулярные вещества, взаимодействующие с доменом холодного шока. Из отобранных веществ в настоящей работе исследовали два, относящиеся к классу галогенпроизводных триазолохиназолин-8-онов.

На первом этапе мы проверили, как влияют отобранные вещества на транслокацию белка YB-1 в ядро на клетках HeLa. Для активации перехода YB-1 в ядро клетки обрабатывали актиномицином Д. Локализацию белка детектировали с помощью флуоресцентной микроскопии, используя антитела против эндогенного YB-1. Было обнаружено, что галогенпроизводные триазолохиназолин-8-онов оказывают ингибирующий эффект на транслокацию YB-1 в ядро. Для выяснения молекулярного механизма влияния изучаемых веществ на транслокацию YB-1 мы проверили их влияние на РНК-связывающую способность белка YB-1 (с помощью связывания комплексов РНК-белок на нитроцеллюлозных фильтрах) и на статус фосфорилирования YB-1 по S102 (Western-blot).

Оказалось, что изучаемые галогенпроизводные триазолохиназолин-8-онов не влияют на фосфорилирование белка по S102, но снижают сродство YB-1 к РНК.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-34-90067.

Литература:

1. Елисеева, И.А. et al., 2011. Y- бокс — связывающий белок 1 (YB-1) и его функции. *Успехи биологической химии*, 51, pp.65–132.

Е.С. Соломатина¹, А.В. Ковалева¹, А.В. Творогова², А.А. Саидова¹, И.А. Воробьев^{1,2}

**ВЛИЯНИЕ МИОЗИНА II НА ПАРАМЕТРЫ
ФОКАЛЬНЫХ КОНТАКТОВ И МИГРАТОРНЫЙ
ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК ЛИНИИ А549**

¹ Кафедра клеточной биологии и гистологии,
Биологический факультет МГУ им. Ломоносова,
Москва, Россия

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

**E.S. Solomatina¹, A.V. Kovaleva¹, A.V. Tvorogova²,
A.A. Saidova¹, I.A. Vorobjev^{1,2}**

**MYOSIN II EFFECT ON FOCAL ADHESION AND
MIGRATION PARAMETERS IN A549 CELL LINE**

¹ Cell biology and histology department, School
of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

² A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
Moscow State University, Moscow, Russia

solomatinaj@gmail.com

Адгезия и контракция клетки, два условия клеточной подвижности, обеспечиваются фокальными контактами (ФК) и немышечным миозином II в составе актомиозинового комплекса. В работе исследовали вклад миозина II в динамику ФК и эффективность миграции опухолевых клеток.

В работе анализировали динамику ФК в клетках А549 (аденокарцинома базального эпителия легких человека) в норме и при воздействии ингибиторов киназ миозина II ROCK и MLCK. В качестве маркера ФК использовали структурный белок винкулин, конъюгированный с RFP. Клетки контроля и эксперимент (час инкубации с 10 мкм Y-27632 или 10 мкм ML-7) снимали в режиме цейтраферной съемки на протяжении 400 мин. (интервал между кадрами 5 мин.). Для 20 клеток проанализированы время жизни и площадь ФК. Для оценки подвижности построены треки миграции.

Большая часть (порядка 80%) ФК находится на периферии (не далее, чем 10 мкм от края клетки). Медиана времени жизни ФК 50 мин. (разброс 10–235 мин., N=100) на краю и 30 мин. (10–200 мин., N=100) в теле клетки. При ингибировании ROCK ФК в теле полностью разбираются, при ингибировании MLCK не изменяются. Время существования ФК на краю увеличивается, как в Y-27632 (медиана 75.2 мин. (15–180, N=50)), так и в ML-7 (медиана 70 мин. (15–270, N=50)).

Медиана площади ФК в контроле на краю составила 0.77 мкм² (0.15–7.71 мкм², N=472) и 0.83 мкм² в теле (0.268–2.41). В Y-27632 ФК на краю уменьшаются (медиана 0.45 мкм², p<0.0001 (0.03–4.25, N=476)). По параметру площади популяция ФК на краю гомогенна.

При ингибировании MLCK большинство ФК уменьшается: на краю медиана площади 0.28 мкм², p<0.0001 (0.06–4.59, N=372), в теле — 0.71 мкм², p<0.0001 (0.198–1.16, N=50). Под действием ML-7 на краю сохраняются единичные крупные и яркие ФК, популяция гетерогенна.

Движение клеток в контроле направленное, медиана эффективности миграции 0.41 (0.10–0.61), медиана

длины пути 100.16 (94.78–105.18) мкм, медиана скорости 15.21 (14.40–15.97) мкм/час. Под действием Y-27632 движение менее направленно: медиана эффективности 0.32 (0.054–0.37), но проходят больший путь: медиана 108.30 (63.03–137.68) мкм, скорость при этом не меняется относительно контроля (15.29 мкм/час, разброс 9.57–20.65 мкм/час). ML-7 снижает подвижность клеток, медиана эффективности падает в два раза, медиана пройденного пути 92.00 (69.91–111.40) мкм, наблюдается небольшое снижение скорости 13.78 (10.61–16.92) мкм/час.

Таким образом, миозин II участвует как в регуляции времени существования и площади ФК, так и в регуляции направленности и скорости клеточной миграции. На краю клетки оба ингибитора приводят к уменьшению площади и увеличению продолжительности жизни ФК, в теле действие ингибиторов различно, что определяет различие характера миграции. Сохраняющиеся под ML-7 в теле клетки и единичные крупные на краю ФК препятствуют движению клеток. Под Y-27632 мелкие ФК на периферии способствуют ненаправленной миграции.

**А.Ю. Столбовая^{1,2}, И.В. Смирнов¹, Н.Л. Вартамян¹,
А.Б. Малашичева², М.П. Самойлович¹**

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ MICA И MICB
В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ**

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

² Национальный исследовательский медицинский
центр им. А.В. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

**A.Yu. Stolbovaia^{1,2*}, I.V. Smirnov¹, N.L. Vartanain¹,
A.B. Malashicheva², M.P. Samoylovich¹**

**MICA AND MICB GENE EXPRESSION
IN CULTIVATED CELL LINES**

¹ Russian Research Center for Radiology and Surgical
Technologies named after academician A.M. Granov,
Saint Petersburg, Russia

² Almazov National Medical Research Center

anastasia.stolbovaya@gmail.com

Белки семейства MIC (MHC class I chain related proteins) представляют собой высокополиморфные трансмембранные гликопротеины и являются лигандами для килинг-активирующего рецептора NKG2D на мембране NK клеток. В норме MIC белки отсутствуют на поверхности клеток, за исключением эпителия желудка и кишечника, клеток эндотелия, синцитиотрофобласта. Экспрессия этих белков значительно увеличивается при повреждении ДНК, трансформации или инфицировании клеток. Взаимодействие MIC белков с рецептором на мембране NK-клеток играет важную роль в элиминации опухолевых клеток. Под действием металлопротеаз происходит образование растворимой формы MIC белков, что способствует избеганию распознавания опухолевых клеток NK клетками. С помощью моноклональных антител возможно ингибировать процесс образования растворимых MIC белков (de Andrade et al., 2018).

Целью данной работы была оценка экспрессии генов белков MICA и MICB в культивируемых клеточных линиях опухолей человека.

Клетки HepG2 (карцинома печени), CaCo2 (аденокарцинома ободочной кишки), T2 (мультиформная глиома),

MeWo (меланома), MCF-7 (карцинома молочной железы), EA.hy926 (клетки эндотелия) культивировали в течение 30 минут при +42°C, через сутки повторно подвергли тепловому шоку (за исключением клеток эндотелия) и затем выделяли тотальную РНК. Методом ПЦР показали, что в опухолевых клетках HerG2, MCF7 и T2 происходила экспрессия обоих генов MICA и MICB. В клетках эндотелия EA.hy926 выявлена только мРНК (кДНК) белка MICA, в клеточных линиях MeWo и CaCo2 обнаружена слабо выраженная экспрессия MICA и MICB соответственно.

По данным секвенирования кДНК экстракционной части MICA, выделенной из клеток HerG2, соответствовала аллели MICA*008, фрагменты кДНК, полученной из клеток MCF-7, соответствовали аллелям MICA*001 и MICB*005. В европейской популяции аллели MICA*008 и MICB*005 наиболее распространены (Carapito and Bahram, 2015).

Опухолевые клеточные линии, подвергнутые воздействию теплового шока, различались по экспрессии генов MIC и обладали различными аллельными вариантами этих белков.

Литература:

1. Carapito, R., & Bahram, S. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunological Reviews*. 2015; 267(1): 88–116.
2. de Andrade, F., L., Tsoucas, D., Badrinath, S., Ito, Y., Yoon, C., Yuan, G.-C., Wucherpfennig, K.W. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science*. 2018; 359(6383): 1537–1542.

А. Сулеймен¹, Б.Б. Рахимова², А.С. Ерубай², С.А. Джангильдинова², Г. Сулеймен³, А.М. Айткулов¹, М.А. Кинаят², Б.Ж. Култанов²

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ СЕМЕННИКОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЫЛЕ-СОЛЕВЫХ АЭРОЗОЛЕЙ АРАЛЬСКОГО МОРЯ

¹ Карагандинский государственный университет им. Е.А. Букетова, Караганда, Казахстан

² Медицинский университет Караганды, Караганда, Казахстан

³ Медицинский университет Астаны, Нур-Султан, Казахстан

A. Suleimen¹, B.B. Rakhimova², A.S. Yerubay², S.A. Jangildinova², G. Suleimen³, A.M. Aitkulov¹, M.A. Kinayotov², B. Zh. Kultanov²

STRUCTURAL CHANGES IN TESTES OF EXPERIMENTAL ANIMALS UNDER INFLUENCE OF DUST-SALINE AEROSOLS OF THE ARAL SEA

¹ E.A. Buketov Karaganda State University, Karaganda, Kazakhstan

² Karaganda Medical University, Karaganda, Kazakhstan

³ Astana Medical University, Nur-Sultan, Kazakhstan

erubai.kz@mail.ru

Аральский кризис признан одной из глобальных экологических проблем современности. Отрицательное воздействие окружающей среды находит свое отражение в ухудшении демографических показателей, снижении функциональных возможностей и защитных сил

организма, росте заболеваемости и смертности населения региона.

Анализ данных литературы показал, что практически отсутствуют исследования влияния пыли-солевых аэрозолей на репродуктивную функцию. В связи с этим, целью нашего исследования явилось изучение влияния пыли-солевых аэрозолей Аральского моря на гистологическую характеристику семенников в условиях эксперимента.

Объектами исследования являлись беспородные крысы, которые были разделены на контрольную и две опытных группы. Животные первой опытной группы подвергались ингаляционной заправке в течение 7 дней, второй опытной группы — в течение 24 дней.

Ингаляционное воздействие на осуществлялось в специальной заправочной камере с внекамерным размещением животных по 4 часа в день. Для заправки применялась пыли-солевая смесь со дна Аральского моря.

Оценивали следующие морфометрические параметры семенников: диаметр извитых семенных канальцев и толщину герминативного слоя.

Было выявлено уменьшение диаметра извитого семенного канальца и уменьшение толщины герминативного слоя в первой опытной группе. Это свидетельствует об отрицательном воздействии компонентов пыли-солевых аэрозолей Аральского моря на репродуктивную функцию крыс-самцов. При этом также определяется включение компенсаторно-восстановительных ресурсов организма животных, что иллюстрируется некоторым повышением значений исследуемых показателей во второй опытной группе. Несмотря на это, диаметр извитых семенных канальцев и толщина эпителиосперматогенного слоя в семенниках крыс, подвергавшихся запылению в течении 24 суток, остаются достоверно меньшими, чем аналогичные показатели в контрольной группе.

И.Б. Сухов¹, О.В. Чистякова¹, К.В. Деркач¹, А.О. Шпак¹

ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ИНСУЛИНА НА ИНСУЛИН-ЗАВИСИМЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ В КАРДИОМИОЦИТАХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), г. Санкт-Петербург, Россия

I.B. Sukhov¹, O.V. Chistyakova¹, K.V. Derkach¹, A.O. Shpakov¹

THE INFLUENCE OF INTRANASAL ADMINISTRATION OF INSULIN ON INSULIN-DEPENDENT SIGNAL SYSTEMS IN RAT CARDIOMYOCYTES IN EXPERIMENTAL TYPE 1 DIABETES MELLITUS

¹ Laboratory of Molecular Endocrinology and Neurochemistry, I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

sukhov.ivan@gmail.com

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) является тяжелым эндокринным заболеванием, причиной которого

является относительная или абсолютная инсулиновая недостаточность. В основе развития СД1 лежат нарушения в инсулиновой сигнальной системе как в периферических органах-мишенях, так и в ЦНС [1, 2]. Патологические процессы в сердце могут приводить к развитию диабетической кардиомиопатии (ДКМ), факт существования которой долгое время не признавался [3]. Роль инсулиновой сигнальной системы в развитии ДКМ остается до конца не выясненной [4, 5].

Цель исследования — изучить в кардиомиоцитах крыс при мягком СД1 инсулин-зависимые сигнальные системы, предполагая их возможное участие в развитии ДКМ.

Результаты. При СД1, на фоне гипоинсулинемии и гипергликемии, уровень экспрессии гена ПКВ (*Akt*) снижался, а гена инсулинового рецептора (*Insr*) — возрастал; на мембранах кардиомиоцитов возрастало число комплексов Na^+/K^+ -АТФазы, содержащих $\alpha 2$ -субъединицу, при этом уровень экспрессии гена $\alpha 2$ -субъединицы (*Atp1a2*) не менялся. Интраназальное введение инсулина (ИВИ) диабетическим крысам снижало уровень инсулина, нормализовало экспрессию гена *Akt* и число комплексов Na^+/K^+ -АТФазы в кардиомиоцитах. Выводы: регуляция трафики везикул, содержащих $\alpha 2$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы, является инсулин-зависимой; ИВИ может отменять возрастание активности миокардиальной Na^+/K^+ -АТФазы у диабетических крыс посредством регуляции экспрессии генов *Akt* и *Insr*. Полученные данные вносят вклад в расшифровку патофизиологических основ развития ДКМ.

Работу проводили с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-015-00139) и по гос. заданию № АААА-А18-118012290427.

Литература:

- Francis G.J., Martinez J.A., Liu W.Q. et al. Intranasal insulin prevents cognitive decline, cerebral atrophy and white matter changes in murine type I diabetic encephalopathy. *Brain*. 2008; 131(12): 3311–34
- Shpakov A., Chistyakova O., Derkach K. et al. Hormonal signaling systems of the brain in diabetes mellitus. *Neurodegenerative Diseases*. 2011. P. 349–386.
- Вайханская Т.Г. Диабетическая кардиомиопатия: два клинических феномена — рестриктивный и дилатационный. Механизмы патогенеза, диагностические критерии и лечение. *Кардиология в Беларуси*. 2015; 5(42): 121–139.
- Bugger H., Abel E.D. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*. 2014; 57(4): 660–671.
- Чистякова О.В., Сухов И.Б., Добрецов М.Г., Кубасов И.В. Изучение активности Na^+/K^+ -АТФазы в миокарде крыс в экспериментальных условиях преддиабета и сахарного диабета. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2020; 56(2): 166–168.

Р.Б. Тагаева^{1,2}, Л.Ю. Яковлева¹, Б.П. Николаев¹, Я.Ю. Марченко¹, Н.М. Юдинцева³, М.А. Шевцов³

ПРИМЕНЕНИЕ КОНЬЮГАТА СУПЕРПАРАМАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ С ГРАНЗИМОМ В (GRB-SPIONS) В ТЕРАНОСТИКЕ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

¹ ФГУП «Государственный Научно-Исследовательский Институт Особо Чистых Биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный Технологический Институт (Технический университет), Санкт-Петербург, Россия

³ Институт цитологии Российской Академии Наук (РАН), Санкт-Петербург, Россия

R.B. Tagaeva^{1,2}, L.Y. Yakovleva¹, B.P. Nikolaev¹, Y.Yu. Marchenko¹, N.M. Yudincheva³, M.A. Shevtsov³

APPLICATION OF SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLE CONJUGATES WITH GRANZYME B (GRB-SPIONS) FOR THERANOSTICS OF BRAIN TUMORS

¹ State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State Institute of Technology (Technical University), Saint-Petersburg, Russia

³ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (RAS), Saint-Petersburg, Russia

tagaeva97@yandex.ru

Несмотря на комбинированный подход в лечении мультиформной глиобластомы головного мозга, который включает в себя хирургическое удаление опухоли с последующими курсами радио- и химиотерапии, общая выживаемость больных не превышает 15 месяцев. Один из перспективных подходов в диагностике и лечении (тераностика) может быть основан на применении суперпарамагнитных наночастиц, специфически направленных к опухолевым клеткам. В данном исследовании в качестве лиганда была использована сериновая протеаза гранзим В, которая распознаёт белок теплового шока Hsp70, представленный на мембране раковых клеток (но не нормальных клеток организма). В серии *in vitro* экспериментов с применением методов конфокальной и электронной микроскопии, проточной цитометрии было показано, что магнитные конъюгаты GrB-SPIONS специфически накапливались в клетках опухоли головного мозга (GL261, U87, C6), оказывая проапоптотическое воздействие. В модели ортотопической опухоли головного мозга человека U87 у иммунодефицитных животных было продемонстрировано, что при внутривенном введении наночастицы спустя 24 часа аккумулировались в глиоме, приводя к её контрастному усилению (по данным магнитно-резонансной томографии). Серийное введение препарата GrB-SPIONS за счёт активации процессов апоптоза приводило к замедлению прогрессии опухоли и, как следствие, увеличению выживаемости животных. Инъекция наночастиц в комбинации с лучевой терапией (10 Гр) также приводила к синергетическому терапевтическому эффекту. Таким образом, полученные магнитные конъюгаты с гранзимом В, по данным доклинических исследований, могут применяться для тераностики новообразований головного мозга.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-08-00024.

Е.К. Тананыкина¹, О.А. Фёдорова¹,
Н.А. Барлев¹, О.Ю. Шувалов¹

**СПЛАЙС-ИЗОФОРМЫ MDM2 В КЛЕТЧНЫХ
МОДЕЛЯХ РАКА ЛЁГКОГО И МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

¹ Институт цитологии Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

E.K. Tananykina^{1*}, O.A. Fedorova¹,
N.A. Barlev¹, O.Y. Shuvalov¹

**SPliced ISOFORMS OF MDM2 IN THE
CELLULAR MODELS OF LUNG AND BREST
CANCER**

¹ Institute of Cytology Russian Academy of Science,
Saint-Petersburg, Russia

liza.tananykina@gmail.com

Е3 убиквитин лигаза MDM2 является негативным регулятором белка-супрессора опухолей p53, конститутивно убиквитинилируя p53, что способствует его протеасомальной деградации. P53, в свою очередь, трансактивирует MDM2. Помимо p53, субстратами убиквитин-лигазы MDM2 являются как белки-супрессоры опухолей (Rb, E-кадгерин и др.), так и известные онкогены (hTert, Snail, Slug). Полноразмерный белок содержит 491 аминокислоту и состоит из N-концевого p53-связывающего домена, центрального «кислотного» и высоко консервативного C-концевого RING-домена, который обеспечивает E3-лигазную активность.

Во многих опухолях человека наблюдается оверэкспрессия как полноразмерной формы MDM2, так и сплайс-изоформ. На данный момент известно более 70 различных вариаций продуктов альтернативного сплайсинга MDM2, однако наиболее часто обнаруживаемыми являются изоформы MDM2-A (ALT2), MDM2-B (ALT1) и MDM2-C (ALT3), которые являются результатом канонического сплайсинга. Общей особенностью трёх основных сплайс-изоформ MDM2 является делеция большей части p53-связывающего, а также центрального «кислотного» доменов. При этом, у них сохраняется C-концевой участок, включающий RING-домен, что способствует их взаимодействию и негативной регуляции полноразмерного белка MDM2 (MDM2-FL). Таким образом, вышеперечисленные сплайс-изоформы не способны взаимодействовать и убиквитинилировать p53, но обладают убиквитин-лигазной активностью и могут подавлять активность основной изоформы. Несмотря на часто детектируемую экспрессию сплайс-изоформ MDM2 (MDM2-A, MDM2-B и MDM2-C) во многих типах опухолей, на сегодняшний день нет чёткого понимания их функций в раковых клетках.

Нами была проведена оценка уровня экспрессии эндогенных полноразмерной, а также сплайс-изоформ MDM2 (A-, -B и -C) при помощи методов ПЦР в реальном времени и иммуноблоттинга в панели клеточных моделей рака лёгкого и молочной железы. Мы показали, что клетки данных линий экспрессируют различные уровни как полноразмерной, так и сплайс-изоформы MDM2.

Для выяснения свойств и молекулярных функций сплайс-изоформ MDM2 нами были созданы клеточные линии карциномы молочной железы и немелкоклеточной аденокарциномы лёгкого с оверэкспрессией полноразмерного MDM2, сплайс-изоформ (-A, -B и -C), а также «мутантного» варианта белка MDM2 (C464A), не обладающего убиквитин-лигазной каталитической активностью.

Полученные клеточные линии будут использованы для оценки влияния сплайс-изоформ MDM2 на пролиферативный и миграционный потенциал раковых клеток, их способность к репарации двуниевых разрывов ДНК и устойчивость к широко используемым химиотерапевтическим препаратам.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 18-75-10076 и РФФИ № 18-315-20013.

Л.А. Таширева, Л.С. Ляпунова,
К.О. Завгородская, А.В. Бузенкова

**ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ХЕЛПЕРНЫХ
ЛИМФОЦИТОВ 1 И 2 ТИПА ВРОЖДЕННОЙ
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНИ
ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ**

Научно-исследовательский институт Онкологии
Томского НИМЦ, Томск, Россия

L.A. Tashireva, L.S. Lyapunova,
K.O. Zavgorodskaya, A.V. Buzenkova

**THE FREQUENCY OF INNATE LYMPHOID
CELLS 1 AND 2 TYPE IN INVASIVE BREST
CARCINOMA TISSUE**

Cancer Research Institute, Tomsk National Research
Medical Center, Tomsk, Russia

lkleptsova@mail.ru

Лимфоциты врожденной иммунной системы (ILC1s) представляют собой гетерогенную популяцию иммунных клеток, открытую в конце 2000-х годов. ILC1s, ILC2s и ILC3s являются конститутивными эквивалентами хелперов адаптивной иммунной системы (CD4+ Т-хелперов): Th1, Th2 и Th17, соответственно, и имеют как одинаковые, так и уникальные функции. Недавние исследования показывают, что ILCs обнаруживаются в тканях различных опухолей. Однако отсутствуют сведения о распространенности и колокализации ILCs в ткани инвазивной карциномы. Исследование проведено на образцах 30 больных с морфологически верифицированным диагнозом инвазивной карциномы молочной железы не специфического типа (ИКНТ), не получавших предоперационного лечения. ILC1s и ILC2s были идентифицированы в ткани методом мультиплексной иммуногистохимии с использованием антител против CD3 (RTU, Dako), Tbet (RTU, Cell Marque), GATA-3 (RTU, Cell Marque) и CK7 (RTU, Dako). Для статистического анализа использовался точный критерий Фишера. В нашем исследовании как ILC1s, так и ILC2s обнаруживались в микроокружении ИКНТ. Не было ни одного случая, когда в опухоли отсутствовали ILCs. В 30% случаев в опухоли одновременно обнаруживались и ILC1s, и ILC2s. Интересно, что, когда в опухоли отсутствовали ILC2s — всегда обнаруживались ILC1s, но не наоборот (p=0,026). Дальнейшие ассоциативные исследования требуются для того, чтобы изучить связь ILCs, обнаруженных в ткани ИКНТ, с параметрами, характеризующими течение и прогрессию заболевания.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации, ИШ-2701.2020.7.

С.В. Тимофеева, А.О. Ситковская,
Э.Е. Росторгуев, Н.С. Кузнецова, С.Ю. Филиппова,
И.В. Межевова, Т.В. Шамова

ПЕРВИЧНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ КАК ИСТОЧНИК БИОМАТЕРИАЛА ДЛЯ СОЗДАНИЯ *IN VIVO* ПОДОБНОЙ МОДЕЛИ ГЛИОМЫ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, 344037, ул. 14 линия, 63, г. Ростов-на-Дону, Россия

S.V. Timofeeva, A.O. Sitkovskaya,
E.E. Rostorguev, N.S. Kuznetsova,
S.Yu. Filippova, I.V. Mezhevova, T.V. Shamova

PRIMARY CELL LINES AS A SOURCE TO CREATE *IN VIVO* LIKE GLIOMA MODEL

National Medical Research Centre for oncology, 344037 St. 14 line, 63, Rostov-on-Don, Russia

timofeeva.sophia@gmail.com

Глиомы являются наиболее распространенным типом первичных опухолей головного мозга, обладают инфильтративным характером роста и имеют тенденцию к увеличению степени злокачественности с течением времени. Эффективным подходом для исследования глиальных опухолей является 3D- моделирование злокачественных новообразований *in vivo*. *In vivo* подобные модели имитируют микроокружение опухоли, поэтому источник клеток для 3D-биопечати должен учитывать способность клеточной культуры к пролиферации и стабильному метаболизму. При резекции опухоли используют флуоресцентный краситель 5-АЛК, для повышения уровня протопорфина IX в опухолевых клетках в течение нескольких часов. Однако воздействие 5-АЛК на клетки *in vitro* не известно.

Целью исследования было создание стабильной жизнеспособной первичной клеточной линии из опухолевой ткани после резекции глиальной опухоли с использованием флуоресцентного красителя 5-ALA для дальнейшего применения в 3D-биопринтинге.

В качестве материала для получения первичной глиальной клеточной культуры были использованы образцы ткани опухоли пациентов с анапластической астроцитомой и глиобластомой с введенной предоперационно 5-АЛК. Клеточные линии глиобластомы культивировали согласно разработанному протоколу [1].

На протяжении 10 пассажей не наблюдалось выраженных морфологических изменений в клетках, что косвенно указывает на низкое содержание протопорфина IX в полученных первичных клеточных культурах. Наличие глиальной морфологии подтверждали положительной экспрессией GFAP. Индекс пролиферации Ki-67 составил 70%.

Материал, полученный во время резекции с использованием 5-ALA, является надежным источником биоматериала для создания *in vivo*-подобной модели глиомы с помощью 3D-биопринтинга.

Работа была одобрена этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, протокол № 33/1 от 29.11.2018г. Все пациенты подписывали информированное согласие.

Литература:

1. S.N. Ignatov, O. Kit, A. Sitkovskaya, E. Rostorguev, N. Kuznetsova, I. Mezhevova, N. Karnaukhov, O. Nistratova, S. Filippova. The patient derived material obtained during tumor resection with used block Blue E400 of microscope OmniPainter™ and

5-aminolevulinic acid (5ALA) proved to be a reliable source of low-differentiated astrocytic tumors primary cell culture. GLIA. 2019; 67(S1): 716–717.

Е.П. Турищева, М.С. Вильданова,
А.А. Саидова, Е.А. Смирнова

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ГОРМОНЫ ВЫЗЫВАЮТ ПОЯВЛЕНИЕ ПРИЗНАКОВ СТРЕССА ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА В ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА

Биологический факультет, Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E.P. Turishcheva, M.S. Vildanova,
A.A. Saidova, E.A. Smirnova

PLANT HORMONES INDUCE ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS FEATURES IN HUMAN DERMAL FIBROBLASTS

Biology faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

kitten-caterina@yandex.ru

Ранее было показано, что растительные гормоны могут индуцировать стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) в культивируемых иммортализованных кератиноцитах человека линии HaCaT. Целью нашего исследования было установить, оказывают ли растительные гормоны такое же действие на клетки другого тканевого происхождения. В связи с этим мы оценили влияние растительных гормонов абсцизовой кислоты (АБК) и гиббереллиновой кислоты (ГК) на состояние ЭПР с помощью световой и электронной микроскопии и на активацию генов стресса ЭПР с помощью ПЦР в реальном времени в культивируемых дермальных фибробластах человека. Анализ морфологии ЭПР показал, что при воздействии ГК наблюдалось набухание цистерн ЭПР (что является одним из признаков стресса этой органеллы), при этом общая морфология сети ЭПР сохранялась. При воздействии АБК изменений обнаружено не было. Кроме того, АБК и ГК оказывали влияние на уровень экспрессии генов белков, активирующих стресс ЭПР и адаптивный ответ на этот стресс (IRE1 α , XBP-1, ATF4, CHOP и GRP78). Это влияние носило сходный характер у всех исследуемых генов, кроме CHOP, и в целом соответствовало эффекту, наблюдаемому при действии индуктора стресса ДТТ. Более того, при действии ДТТ и исследуемых растительных гормонов наблюдалось повышение уровня экспрессии одного из генов дифференцировки дермальных фибробластов в миофиобласты — гладкомышечного актина (α -SMA). Полученные нами данные могут свидетельствовать о том, что растительные гормоны АБК и ГК стимулируют дифференцировку фибробластов в миофиобласты через индукцию стресса ЭПР, поэтому в дальнейшем мы планируем исследовать интенсивность синтеза белков-маркеров стресса ЭПР после воздействия АБК и ГК, а также влияние этих растительных гормонов на проявление других признаков дифференцировки фибробластов, таких как повышение продукции коллагена первого типа.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-015-00233).

**А.А. Фалеева^{1,2}, Т.Н. Субботина^{1,2},
Е.А. Дунаева³, К.О. Миронов³, М.А. Михалёв⁴,
Е.В. Васильев⁵, А.А. Савченко¹**

АЛГОРИТМ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ЭРИТРОЦИТОЗОМ

- ¹ ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия
² ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России», Красноярск, Россия
³ ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия
⁴ МБУЗ «Городская Клиническая Больница № 7», Красноярск, Россия
⁵ КГБУЗ «Краевая клиническая больница», Красноярск, Россия

**A.A. Faleeva^{1,2}, T.N. Subbotina^{1,2},
E.A. Dunaeva³, K.O. Mironov³, M.A. Mihalev⁴,
E.V. Vasiliev⁵, A.A. Savchenko¹**

ALGORITHM OF GENETIC EXAMINATION OF PATIENTS WITH ERYTHROCYTOSIS

- ¹ Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
² The Federal State-Financed Institution Federal Siberian Research Clinical Centre under the Federal Medical Biological Agency, Krasnoyarsk, Russia
³ Federal Budget Institute of Science "Central Research Institute for Epidemiology", Moscow, Russia
⁴ Municipal Budget Health Service Institution "City Clinical Hospital № 7", Krasnoyarsk, Russia
⁵ Krasnoyarsk regional hospital, Krasnoyarsk, Russia

miss.anastasia-box@yandex.ru

Существует алгоритм обследования пациентов с эритроцитозами разной этиологии, при котором на первом этапе ДНК пациентов исследуют на наличие мутаций в 14 и 12 экзонах гена JAK2 с целью исключения такого клонального заболевания, как хроническое миелопролиферативное заболевание (ХМПЗ). Также в последнее время в литературе встречаются данные о редких случаях выявления мутаций в гене CALR, ассоциированных с ХМПЗ. Вследствие этого ставится вопрос о необходимости проведения анализа мутаций в гене CALR пациентам с эритроцитозами, а также внесением дополнений в алгоритм генетического обследования таких пациентов. Кроме того, для пациентов отрицательных по JAK2 и CALR, у которых отсутствуют мутации, ответственные за развитие клонального заболевания, необходимо проводить исследование в генах белков кислород — чувствительного пути (EPOR, VHL, HIF2 α), приводящих к различным типам семейного эритроцитоза.

Цель работы — дополнить алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозом.

В исследование были включены образцы ДНК от 38 JAK2 (12 и 14 экзоны)-негативных пациентов с изолированным эритроцитозом, высокими значениями гематокрита и гемоглобина. Качественный анализ мутаций в гене CALR у пациентов с эритроцитозом проводили с использованием разработанной ранее в лаборатории молекулярно-генетических методов исследований СФУ технологии гетеродуплексного анализа с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза в вертикальном ПААГ. Исследование на наличие мутаций в генах EPOR, VHL, HIF2 α , ответственных за развитие первичного и вторичного эритроцитозов проводили с использованием секвенирования по Сенгеру.

На первом этапе работы всем пациентам был проведен анализ на наличие мутаций в гене CALR с целью исключения ХМПЗ. У 1 человека была обнаружена мутация в гене CALR, в совокупности с клиническими данными и результатами морфологического исследования костного мозга был выставлен диагноз ХМПЗ. На втором этапе работы для 37 пациентов был проведен анализ на наличие мутаций в генах EPOR, VHL, HIF2 α . Мутации в гене EPOR, ответственного за развитие первичного врожденного эритроцитоза, обнаружены у 2 пациентов, мутации в гене VHL, приводящие к вторичному врожденному эритроцитозу третьего типа обнаружены у 2 человек, причем у одного из них обнаружена мутация, ассоциированная с Чувашской полицитемией. Мутации в гене HIF2 α в 9 экзоне, приводящие к вторичному врожденному эритроцитозу четвертого типа обнаружены у 3 человек.

С целью дифференцировки между клональным заболеванием и случаем семейного эритроцитоза для пациентов с эритроцитозами неясной этиологии предлагаем дополнить алгоритм генетического анализа путем проведения исследований в генах белков кислород — чувствительного пути. Использование предложенного дополненного алгоритма позволило уточнить диагноз для 8 из 38 пациентов с эритроцитозами неясной этиологии. Одному из пациентов установлен диагноз ХМПЗ, 7 пациентов имеют различные типы семейных эритроцитозов.

И.А. Филонова, В.В. Лемещенко СТРУКТУРНАЯ НЕЗАВЕРШЕННОСТЬ КОМПОНЕНТОВ МИОКАРДА У НОВОРОЖДЕННЫХ ЯГНЯТ

*Крымский федеральный университет имени
В.И. Вернадского, Симферополь, Россия*

I.A. Filonova, V.V. Lemeshchenko STRUCTURAL UNCOMPLETENESS OF COMPONENTS OF MYOCARDIUM IN NEONATAL LAMBS

*V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol,
Russia*

Inna29Filonova@rambler.ru

Современные изыскания особенностей миокарда млекопитающих указывают на его незавершенную морфологию на ранних этапах постнатального развития с сохранением определенных черт структуры предыдущих возрастных периодов. При этом преобладают данные, полученные на материале от человека и лабораторных животных [1, 2].

Цель исследований — установить соотношение миокардиоцитов и стромальных компонентов в различных участках сердца у суточных ягнят.

Исследовали сердце ягнят суточного возраста (n=7), используя комплекс микроморфологических, морфометрических и статистических методов.

В правом предсердии у суточных ягнят кардиомиоциты со слабо выраженной порперечной исчерченностью формируют пучки и имеют относительную площадь 83,13 \pm 2,41%, из них рабочих — 83,02 \pm 2,21%, проводящих — 0,11 \pm 0,05%. Относительная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани достигает 6,93 \pm 4,21%. Артерии и вены мышечного типа, а также кровеносные сосуды микроциркуляторного русла (9,94 \pm 6,30%) проходят в рыхлой волокнистой соединительной ткани. В левом предсердии кардиомиоциты так же, как и в правом

расположены пучками. Их относительная площадь составляет $77,37 \pm 0,57\%$, из них рабочих — $77,09 \pm 1,26\%$, а проводящих — $0,28 \pm 0,02\%$. Относительная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани — $7,12 \pm 0,23\%$ и кровеносных сосудов — $15,51 \pm 2,93\%$. В правом желудочке относительная площадь кардиомиоцитов составляет $87,46 \pm 0,46\%$, в том числе рабочих — $76,04 \pm 3,71\%$ и проводящих — $8,57 \pm 0,62\%$. Относительная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани — $5,71 \pm 0,34\%$, а кровеносных сосудов — $6,83 \pm 0,03\%$. В миокарде левого желудочка кардиомиоциты достигают $68,72 \pm 1,52\%$. Из них рабочих — $58,01 \pm 0,51\%$ и проводящих — $10,71 \pm 0,47\%$. Относительная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани составляет $19,08 \pm 4,25\%$ и кровеносных сосудов — $12,2 \pm 0,57\%$. В межпредсердной и межжелудочковой перегородках относительная площадь кардиомиоцитов наибольшая — $94,45 \pm 4,61\%$, соответственно $84,83 \pm 1,56\%$ рабочих и $9,62 \pm 0,51\%$ проводящих. Относительная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани составляет $1,43 \pm 0,04\%$, а кровеносных сосудов — $4,12 \pm 0,45\%$.

Таким образом, у суточных ягнят наибольшая относительная площадь кардиомиоцитов, имеющих слабую поперечную исчерченность, проявляется в перегородках камер сердца и правом предсердии с превалированием рабочих кардиомиоцитов. Количество же стромальных компонентов существенно меньше вне зависимости от их органотопии.

Литература:

1. Аболеева Д.В. Рост, развитие и резистентность новорожденных ягнят от маток разного возраста. Овцы, козы, шерстяное дело. 2008; 4: 16–20.
2. Андриенко Д.А., Шкилев П.Н. Особенности экстерьера и изменения параметров тела молодняка овец ставропольской породы в постнатальном онтогенезе. Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2009; 1. 22(2): 90–92.

А.А. Фирсенкова^{1,2}, А.А. Пиневиц^{1,2},
О.А. Шашкова¹, И.С. Малахов¹, М.А. Берлина¹,
Л.А. Терехина¹, М.П. Самойлович^{1,2}

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ СОСУДИСТОЙ СЕТИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ У КРЫС С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ЭНДОГЛИНА

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

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

A.A. Firsenkova^{1,2}, A.A. Pinevich^{1,2},
O.A. Shashkova¹, I.S. Malahov¹, M.A. Berlina¹,
L.A. Terekhina¹, M.P. Samoylovich^{1,2}

VISUALIZATION OF THE VASULATURE OF RAT SOLID TUMORS USING ANTI-ENDOGLIN MONOCLONAL ANTIBODIES

¹ Russian Research Center for Radiology and Surgical
Technologies named after A.M. Granov, Saint
Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg,
Russia

firsenkova.alexandra@yandex.ru

Эндоглин (CD105) — гликопротеин, который активно экспрессируется на поверхности эндотелия в ходе ангиогенеза и рассматривается как мишень антиангиогенной терапии опухолей.

Целью работы явилась характеристика развития сосудистой сети солидных опухолей, полученных в результате гетеротопических прививок крысам глиом линий С6 и С6-hLEng. Линия С6 не экспрессирует эндоглин крыс, ее используют для создания моделей глиом крыс, обладающих биологическими свойствами глиом человека. Линия С6-hLEng, полученная из клеток С6 в результате трансфекции, имеет мембранный эндоглин человека.

Васкуляризацию опухолевой ткани оценивали путем рутинного гистологического окрашивания. Локализацию CD105 выявляли с помощью моноклональных антител, перекрестно реагирующих с CD105 человека и крысы.

Через 4–8 суток после прививки крысам клеток линий С6 или С6-hLEng в месте инъекции развивались опухоли. При подкожной прививке клеток (в загривок или в стопу) наблюдалась интенсивная васкуляризация опухолей, причем инъекция в загривок отличалась более высокой степенью формирования сосудистой сети. В случае внутримышечной прививки васкуляризация глиом была существенно меньше. В тканях опухолей на поздних сроках были выявлены множественные очаги некроза. Характер васкуляризации глиом не зависел от использованной линии опухолевых клеток.

Экспрессия CD105 крыс была выявлена на поверхности эндотелия формирующихся сосудов в опухолях С6 и С6-hLEng при всех использованных способах прививок. Экспрессия CD105 человека в опухоли из привитых клеток С6-hLEng сохранялась, однако со временем количество CD105+ клеток уменьшалось в результате развития иммунного ответа, приводящего к позитивной селекции клеток, потерявших экспрессию антигена человека.

Таким образом, характер васкуляризации глиом С6 и С6-hLEng при гетеротопических прививках крысам определяется местом прививки опухоли и не зависит от экспрессии CD105 человека опухолевыми клетками.

З.М. Хайруллина^{1,2}, В.Ю. Васильева¹,
А.В. Сударикова¹, Ю.А. Негуляев¹,
В.И. Чубинский-Надеждин¹

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИИ ЧЕЛОВЕКА К562

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

Z.M. Khairyllina^{1,2}, V.Y. Vasileva¹, A.V. Sudarikova¹,
Y.A. Negulyav¹, V.I. Chubinskiy-Nadezhdin¹

FUNCTIONAL ANALYSIS OF CALCIUM- DEPENDENT POTASSIUM CHANNELS ACTIVITY IN HUMAN MYELOID LEUKAEMIA K562 CELLS

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic
University, Saint-Petersburg, Russia

khairyllinaa@mail.ru

В предшествующих работах были исследованы механочувствительные каналы (МЧК), обеспечивающие вход катионов, в том числе ионов кальция, в клетки миелоидной лейкемии человека К562. С помощью метода

локальной фиксации потенциала (патч-кламп) нами был показан феномен сопряженной активации МЧК и кальций-зависимых калиевых каналов (KCa) в плазматической мембране клеток K562 [Chubinskiy-Nadezhdin V.I. et al. 2014, Чубинский-Надеждин В.И. и др. 2019]. Мы показали, что локальный вход кальция через МЧК активирует колокализованные с ними KCa каналы, не имеющие собственной механической чувствительности. По значениям унитарной проводимости в физиологических условиях в качестве молекулярных коррелятов KCa каналов могут рассматриваться как каналы малой проводимости (SK), так и средней проводимости (IK). Однозначная идентификация молекулярной принадлежности каналов возможна с помощью селективного ингибиторного анализа. Кроме того, важным вопросом остается уровень интегральной активности KCa каналов и их вклад в транспорт ионов калия в клетках K562.

Целью настоящей работы было осуществить оценку вклада кальций-зависимых калиевых каналов малой (SK) и средней проводимостей (IK) в калиевые интегральные токи клеток K562. Были использованы селективные блокаторы SK и IK каналов: компонент яда пчелы — апамин и синтетический аналог клофидразола — TRAM-34 соответственно.

Для регистрации интегральных ионных токов использовали метод patch-clamp в режиме отведения от всей клетки (whole-cell). SK и IK каналы активируются при внутриклеточной концентрации кальция от 10^{-7} M и выше. В связи с этим, в наших опытах для достижения максимального уровня активности SK и IK каналов использовали раствор, имитирующий внутриклеточный, с концентрацией кальция 10^{-6} M. После формирования whole-cell конфигурации записывали токи от всей клетки в контроле (до подачи ингибиторов) и после добавления апамина и TRAM-34 во внеклеточный раствор. Запись токов производили с помощью автоматического протокола (voltage step) при значениях мембранных потенциалов от -20 мВ до +80 мВ, подаваемых в течение 2 сек с шагом 10 мВ. Для оценки вклада SK и IK каналов рассчитывали средние значения интегрального тока на потенциалах от +20 до +80 мВ в контроле и после добавления ингибиторов. Достоверность изменений оценивали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA, $p < 0.05$). Обработка записей интегральных токов показала, что средний вклад калиевых токов, переносимых каналами SK, составляет $42,68 \pm 5,59\%$ (N=3), а суммарный вклад каналов SK и IK — $71,10 \pm 9,96\%$ (N=3) от контрольных значений калиевого тока в клетках K562. Таким образом, с помощью селективного ингибиторного анализа мы выявили функциональную экспрессию каналов SK и IK в плазматической мембране клеток K562. Результаты опытов демонстрируют, что исследуемые KCa каналы являются основной компонентой интегральных токов, переносимых ионами калия в клетках K562.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда № 19-75-00046 (Чубинский-Надеждин В.И., Васильева В.Ю.) и РФФИ № 19-015-00211 (Сударикова А.В.)

Е.Н. Чернец¹, С.Н. Бардаков², Р.М. Магомедова³, З.Р. Умаханова³, К.З. Зульфугаров³, П.Г. Ахмедова³, В.А. Царгущ², А.А. Титова⁴, М.О. Мавликеев⁴, В.Л. Зорин², Г.Д. Далгатов⁵, А.А. Исаев⁶, Р.В. Деев^{1,6}

ВНУТРИСЕМЕЙНЫЙ ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ КОЛЛАГЕН VI-АССОЦИИРОВАННЫХ МИОПАТИЙ

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, РФ

² ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», Санкт-Петербург, РФ

³ ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Дагестан, РФ

⁴ ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», Казань, РФ

⁵ ФГБУ «НКЦ Оториноларингологии ФМБА России», Москва, РФ

⁶ ООО ЦГРМ «ГенетикО», Москва, РФ

E.N. Chernets¹, S.N. Bardakov², R.M. Magomedova³, Z.R. Umakhanova³, K.Z. Zulfugarov³, P.G. Akhmedova³, V.A. Tsargush², A.A. Titova⁴, M.O. Mavlikeev⁴, V.L. Zorin², G.D. Dalgatov⁵, A.A. Isaev⁶, R.V. Deev^{1,6}

INTRAFAMILIAL PHENOTYPIC POLYMORPHISM OF COLLAGEN VI-RELATED MYOPATHY

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

² Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Saint-Petersburg, Russia

³ Dagestan State Medical University, Makhachkala, Russia

⁴ Kazan Federal University, Kazan, Russia

⁵ Scientific and Clinical Center of Otorhinolaryngology of the Federal Medico-Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, Russia

⁶ Human Stem Cell Institute, Moscow, Russia

karyj44@gmail.com

Коллаген 6-ассоциированные миопатии — одна из распространенных групп врожденных миодистрофий, включающая миопатию Бетлема (OMIM #158810), Ульриха (OMIM #254090) и промежуточные фенотипы. Причина заболевания — мутации в генах COL6A1, COL6A2 (21q22.3) и COL6A3 (2q37), кодирующих субъединицы коллагена VI типа: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$.

Представляем наблюдение 5 sibсов с фенотипическим полиморфизмом врожденной миопатии вследствие новой гомозиготной мутации chr21: 47402679 T>C в каноническом сайте сплайсинга интрона 2 (c.227 + 2T>C) гена COL6A1. У 3 sibсов (48, 53 и 2,5 года) установлена миопатия Ульриха, у одного sibса (58 лет) — миосклеротическая миопатия Бетлема. Мать пробанда — носитель гетерозиготной мутации (c.227 + 2T>C) в гене COL6A1.

Анализ мРНК выявил у всех sibсов пропуск 2 экзона — причину делеции 925 аминокислот в 94–95% аберрантных транскриптов. Сохранено 5–6% нормальных транскриптов. ПЦР с обратной транскрипцией выявила дополнительную полосу мРНК с более быстрой миграцией на дорожках всех sibсов.

Оценка секретируемого коллагена VI типа определила отсутствие внеклеточных волокон и диффузное накопление фибробластами предшественников коллагена VI типа.

Анализ мРНК, пролиферативных и культуральных свойств фибробластов и оценка секретируемого коллагена VI не выявили различий между сибсами. Внутрисемейный фенотипический полиморфизм, вероятно, объясняется влиянием еще не известных генов модификаторов.

**О.Н. Чернова¹, М.О. Мавликеев¹, И.С. Лимаев¹,
М.В. Елистратова¹, А.П. Киясов¹, Р.В. Деев^{2,3}**

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО И РЕПАРАТИВНОГО
МИОГИСТОГЕНЕЗА ПРИ МУТАЦИИ В ГЕНЕ
DYSF**

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия

**O.N. Chernova¹, M.O. Mavlikeev¹, I.S. Limaev¹,
M.V. Elistratova¹, A.P. Kiyasov¹, R.V. Deev^{2,3}**

**MORPHOLOGICAL FEATURES
OF PHYSIOLOGICAL AND REPARATIVE
MYOHISTOGENESIS IN DYSF GENE MUTATION**

¹ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

² North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

³ Human Stem Cell Institute, Moscow, Russia

olgachernova92@yandex.ru

Дисферлинопатии — группа наследственных нервно-мышечных заболеваний, в основе которых лежат мутации в гене *DYSF*. Дисферлин — белок сарколеммы, участвующий в формировании временной заплатки («патча») при повреждении мышечного волокна (МВ), что препятствует его дальнейшей гибели. Для изучения дисферлинопатий *in vivo* выведен ряд нокаутных животных, одними из которых являются мыши линии Bla/J с отсутствием экспрессии дисферлина.

Целью исследования стала патоморфологическая оценка физиологического и репаративного миогистогенеза у мышей линии Bla/J. Материалы и методы. Для оценки состояния скелетных мышц в онтогенезе были взяты мышцы голени мышей линии Bla/J и C57Bl/6 (дикий тип) в возрастах от 1, 10, 20 сут., 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 15 и 18 мес. жизни. Для оценки репаративной регенерации скелетных мышц в медиальную головку правой икроножной мышцы всем животным вводили 100 мкл 0,1% раствора новокаина: 16 мышам линии Bla/J и 16 мышам линии C57Bl/6. Выведение животных осуществляли на 2, 4, 10 и 14 сутки после инъекции (n=4). Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори, иммуногистохимически с антителами к альфа-ГМА, Ki-67, миогенину. Морфометрия срезов была произведена в программе ImageJ (NIH, США).

Было выявлено статистически достоверное отличие в доле некротизированных МВ у мышей линии Bla/J с 3 мес. жизни с постепенным ростом показателя до 18 мес. Доля миогенин-позитивных ядер была ниже по сравнению с контрольной группой с максимальным значением 1,29(1,1;2,45)% в 4 мес. Постепенное увеличение размеров МВ до 7 мес. у мышей Bla/J сменилось их последующей атрофией. Сосудистая плотность (соотношение количества МВ к количеству сосудов) была

выше в контрольной группе с максимальным значением 90,0(78,3;94,1)% в 7 мес., в то время как для мышей линии Bla/J этот показатель был максимальным в 3 мес.

По результатам сравнительного патоморфологического анализа у мышей двух линий было выявлено снижение репаративных способностей (более высокая доля некротизированных МВ, компенсаторная гипертрофия МВ с последующей их атрофией, снижение пролиферативной активности и уровня миогенной дифференцировки) мышечной ткани у мышей с наследственной патологией скелетных мышц.

При исследовании реактивности скелетных мышц в ответ на острое химическое повреждение было обнаружено, что репарация в условиях отсутствия дисферлина претерпевает те же стадии, что и в нормальной мышечной ткани, однако с некоторыми отличиями: альтерация протекает интенсивнее с большей долей некроза, процессы восстановления замедлены, пролиферативная активность снижена, дифференцировка отсроченная и не завершенная, степень ремоделирования ниже.

**М.В. Чернолучский, А.В. Панова,
О.В. Волкова, М.Н. Калинин**

**ОЦЕНКА ВКЛАДА СИСТЕМНЫХ
И КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ
В ФОРМИРОВАНИЕ ТКАНЕВОЙ АДАПТАЦИИ
К ЛИПИДНОЙ НАГРУЗКЕ**

Тверской государственный медицинский университет, Тверь, Россия

**M.V. Chernorutskiy, A.V. Panova,
O.V. Volkova, M.N. Kalinkin**

**EVALUATION OF THE CONTRIBUTION
OF SYSTEMIC AND CELLULAR MECHANISMS
IN FORMATION OF TISSUE ADAPTATION
TO LIPID LOAD**

Tver State Medical University, Tver, Russia

michail1911@mail.ru

Установлена тесная связь между патогенезом атеросклероза и липидным обменом, в частности перегрузкой транспортной емкости крови липидами. При этом не ясно, является ли гиперлипидемия вторичной по отношению к дисбалансу липидного обмена или занимает ключевую роль в его происхождении. Целью настоящей работы была оценка вклада системных и клеточных механизмов в формирование адаптации к гиперлипидемии, вызванной инъекциями жировой эмульсии препарата липофундин.

В работе использовали жировую ткань интактных кроликов и животных с экспериментальной гиперлипидемией. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) выделяли из целых эксплантов или после их ферментативной обработки коллагеназой. Клетки поддерживали на среде DMEM с добавлением сыворотки. Спонтанный и индуцированный адипогенез верифицировали окраской липофильным красителем Oil Red O. Добавление липофундина к среде роста *in vitro* способствовало спонтанному адипогенезу клеток, полученных от интактных животных, а в присутствии индукторов адипогенеза меняло морфологию клеток, делая их полигональными и обеспечивая накопление мелких жировых капель. Предшествующая системная липидная нагрузка повышала адипогенный потенциал МСК в культуре. Полученные результаты свидетельствуют, что тканевая адаптация к гиперлипидемии сопровождается

увеличением доли быстро пролиферирующих и коммитированных преадипоцитов. Для оценки роли растворимых факторов экспланты жировой ткани культивировали в присутствии различных сывороток. Клетки из эксплантов контрольных животных уверенно образовывали монослой в присутствии бычьей сыворотки (BS), но не сыворотки кролика. Напротив, клетки из эксплантов экспериментальных животных размножались и в присутствии сыворотки кролика. По способности стимулировать пролиферацию сыворотки разных доноров располагались в ряд: сыворотка интактных кроликов > сыворотка на высоте гиперлипидемии > сыворотка после нормализации показателей крови.

Таким образом системная липидная нагрузка увеличивает пролиферативный потенциал жировой ткани. В формировании тканевого ответа принимают участие растворимые факторы сыворотки крови.

А.В. Чубарь^{1,3}, Н.Ю. Семенова², Н.И. Енукашвили^{1,4}
ТРАНСКРИПЦИЯ ТАНДЕМНО
ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ДНК В МЕЗЕНХИМНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПОВРЕЖДЁННОЙ
ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ НИШИ

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

³ ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, НИЛ клеточных технологий, Санкт-Петербург, Россия

A.V. Chubar^{1,3*}, N.Yu. Semenova², N.I. Eukashvily^{1,4}
TRANSCRIPTION OF TANDEM REPEAT DNA
IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM
IMPAIRED HEMATOLOGICAL NICHE

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology FMBA of Russia, Saint-Petersburg, Russia

³ Pokrovskii Stem Cell Bank, Saint-Petersburg, Russia

⁴ Cell Technologies Lab, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

annachubar95@gmail.com

Сателлиты 2, 3 человека (HS2,3) — тандемно расположенные формирующие перицентромерные участки хромосом. В клетках здоровой ткани транскрипция этих последовательностей блокируется, однако соответствующие РНК обнаруживают в клетках солидных опухолей, что, предположительно, играет роль в прогрессии заболеваний. Однако информация об их распределении при онкогематологических заболеваниях ограничена. Целью работы было сравнение транскрипционной активности HS2,3 в мезенхимных стромальных клетках (МСК) пациентов с множественной миеломой (ММ) при разной эффективности лечения.

Работа проводилась на первичных культурах МСК, полученных из материала стерильной пункции 3 здоровых доноров (ЗД) и 12 пациентов с ММ. Пациенты были разделены на две группы по типу ответа на терапию: группу с неэффективным лечением (НЛ, n=3) и группу с частичным или полным ответом на лечение (Ч/ПОЛ, n=9). Для полученных культур определяли иммунофенотип, пролиферативную активность,

потенциал к остеогенной дифференцировке, наличие маркеров опухоль-ассоциированных фибробластов (α -гладкомышечный актин (α -ГМА), ассоциированная со старением β -галактозидаза). Транскрипты выявляли с помощью ДНК-РНК FISH. Для определения влияния клеток ММ на МСК проводили бесконтактное и контактное сокультивирование МСК ЗД с клетками линии RPMI-8226 из крови ММ пациента с дальнейшим выявлением транскриптов в клетках.

Количество гибридационных сигналов HS2,3 в МСК коррелировало с уровнем синтеза маркеров опухолевого микроокружения и увеличивалось в ряду ЗД < Ч/ПОЛ < НЛ. Кроме того, наблюдалось снижение скорости пролиферации и остеогенно-дифференцировочного потенциала. Сокультивирование с клетками ММ приводило к увеличению синтеза α -ГМА и транскрипции HS2,3 в МСК ЗД. До сокультивирования в МСК ЗД транскрипты HS2,3 не выявлялись. В клетках линии RPMI-8226 транскрипты не обнаруживались ни до, ни после сокультивирования с МСК.

Таким образом, транскрипция HS2,3 в МСК опухолевого микроокружения пациентов с ММ коррелирует с прогрессией заболевания. Опухолевые клетки могут индуцировать транскрипцию HS2,3 одновременно с индукцией остальных признаков опухоль-ассоциированных МСК. Мы полагаем, что транскрипция прицентромерных сателлитов является одной из составных частей опухоль-ассоциированного фенотипа МСК.

Работа выполнена в рамках грантов Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-6706.2018.7, РФФ 19-74-20102 и РФФИ 19-34-80032.

В.С. Шадрин, П.М. Кожин,
А.Л. Русанов, Н.Г. Лузгина

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ
К МОДЕЛИРОВАНИЮ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ
ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ
В ОБЛАСТИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО РУБЦА

Научно-исследовательский институт
 биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
 Москва, Россия

V.S. Shadrin, P.M. Kozhin, A.L. Rusanov, N.G. Luzgina
DEVELOPMENT OF APPROACHES
TO MODELING PATHOLOGICAL HYPERPLASTIC
PROCESSES IN THE POSTOPERATIVE SCAR
AREA

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

valerianshadrin@gmail.com

Одной из самых распространенных проблем при заживлении ран является развитие гиперпластических процессов, приводящих к образованию гипертрофических и келоидных рубцов. Оба варианта рубцов являются проявлением фибропролиферативного расстройства, для которого характерна чрезмерная активация фибробластов в ране и aberrантное образование внеклеточного матрикса, ассоциированные с высокой пролиферативной активностью других типов клеток, участвующих в регенерации (кератиноциты, макрофаги, эндотелиоциты). Моделирование патологических процессов открывает новые возможности для исследования их патогенеза и разработки новых эффективных средств лечения

и профилактики. Однако задача экспериментального моделирования гипертрофических и/или келоидных рубцов в полной мере не решена.

Целью исследования была разработка клеточной модели для изучения патологических гиперпластических процессов в области послеоперационного рубца, получаемой на основе сфероидов фибробластов кожи человека, культивируемых в условиях контролируемой стандартизированной профиброгенной стимуляции.

В рамках работы использовались различные клеточные линии фибробластов кожи человека. Для каждой из клеточных линий было изучено влияние фиброгенных факторов (TGF β 1, FGF2) на пролиферативную и миграционную активность, морфологию клеток, а также на экспрессию ряда генов, повышенная активность которых характерна для гиперпластических процессов в локусах повреждения кожи. Для моделирования трехмерных процессов в области рубца фибробласты кожи культивировали в U-образных планшетах с низкой адгезией поверхности.

Была установлена дозозависимая способность TGF β 1 и FGF2 увеличивать пролиферативную и миграционную активность фибробластов кожи человека. Охарактеризованы морфологические изменения клеток различных линий на фоне профиброгенной стимуляции, особенности процесса формирования сфероидов. Показано, что использованные в работе фиброгенные факторы оказывали влияние на размер сфероидов и увеличивали экспрессию маркерных генов, активность которых характерна для гиперпластических процессов в локусах повреждения кожи. Продемонстрировано наличие в сфероидах некротического центра, аналогичного гипоксическому центру в гипертрофических и келоидных рубцах.

Таким образом, разработанный подход к моделированию патологических гиперпластических процессов в области послеоперационного рубца является перспективным и может быть использован для *in vitro* исследования их патогенеза, а также доклинической разработки профилактических и терапевтических средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 05.604.21.0219, Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60419XO219).

**К.Ю. Шардина, С.А. Заморина,
В.П. Тимганова, М.С. Бочкова**

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК (MDSC)

Институт экологии и генетики микроорганизмов — филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского Отделения Российской Академии Наук, Пермь, Россия

**K.Yu. Shardina, S.A. Zamorina,
V.P. Timganova, M.S. Bochkova**

THE INFLUENCE OF GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON DIFFERENTIATION OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS (MDSC)

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms — branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

shardinak@gmail.com

В настоящее время оксид графена (ОГ) является перспективным материалом, применяемым в терапии и диагностике заболеваний. Известно, что модификация наночастиц ОГ некоторыми полимерами способствует уменьшению токсичности и улучшению биосовместимости с клетками иммунной системы [1]. В нашем исследовании были использованы наночастицы ОГ, функционализированные полиэтиленгликолем (ОГ-ПЭГ). Взаимодействие новых наноматериалов с клетками иммунной системы находится в фокусе современной науки. Нашим объектом были миелоидные супрессорные клетки (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) — гетерогенная популяция незрелых клеток миелоидного происхождения, которые при патологических состояниях приобретают супрессорный фенотип. Целью работы являлось изучение влияния наночастиц ОГ-ПЭГ на дифференцировку MDSC человека в условиях *in vitro*.

В работе были использованы частицы ОГ размером 1–5 мкм (Ossila Ltd., Великобритания), модифицированные ПЭГ. Для генерации MDSC мононуклеарные клетки из периферической крови доноров-добровольцев (МПК) сепарировали центрифугированием на градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 г/см³). Затем МПК культивировали в 96-луночном планшете в концентрации 1х10⁶ кл/мл в ППС с внесенными цитокинами IL-6 (20 нг/мл), GM-CSF (40 нг/мл) в течение 7 суток при 5% CO₂ и 37°C. На 4 сутки производили замену среды и вносили ОГ-ПЭГ в концентрациях 2,5; 5 и 10 мкг/мл. После стандартных процедур отмывки оценивали общее количество MDSC (LIN⁻HLA-DR⁻CD33⁺CD11b⁺), учитывая субпопуляции: полиморфноядерные (PMN-MDSC) и моноцитарные (M-MDSC) [2]. Измерения проводили на цитометре CytoFlex S (Beckman Coulter). Статистическую обработку данных осуществляли в GraphPad Prism 6, с использованием непараметрического критерия Манна — Уитни.

В результате экспериментов было установлено, что процент MDSC в культурах с низкими концентрациями ОГ-ПЭГ (2,5 и 5 мкг/мл) повышался, а в культурах с более высокой концентрацией (10 мкг/мл), наоборот, снижался. При анализе субпопуляций MDSC было показано, что ОГ-ПЭГ (2,5 и 5 мкг/мл) вызывал снижение процента процента PMN-MDSC, то есть повышение общего уровня MDSC в данном случае было обусловлено именно моноцитарным пулом MDSC. В целом, мы впервые показали, что наночастицы ОГ-ПЭГ могут разнонаправленно регулировать дифференцировку MDSC, в зависимости от концентрации снижая или стимулируя дифференцировку этих клеток. Таким образом, наночастицы ОГ обладают потенциалом к манипулированию MDSC, которые являются супрессорами иммунного ответа.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ 19-15-00244.

Литература:

- Li Z., Wang Y., Zhu J., Zhang Y., Zhang W., Zhou M., Luo C., Li Z., Cai B., Gui S., He Z., Sun J. Journal of Controlled Release. 2020; 320: 1–18.
- Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nature reviews Immunology. 2012; 12(4): 253–268.

О.Ю. Шувалов, А.И. Кизенко,
О.А. Федорова, А.А. Дакс, Н.А. Барлев
**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ
СЕМЕНОГЕЛИНОВ 1 И 2 В КЛЕТЧНЫХ
МОДЕЛЯХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

O. Shuvalov, A. Kizenko, O. Fedorova
A. Daks, N. Barlev

**BIOLOGICAL FUNCTIONS OF SEMENOGELINS
1 AND 2 IN CELL MODELS OF HUMAN CANCER**

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

oleg8988@mail.ru

Семеновелины 1 и 2 (СГ1 и 2, СГ1/2) — аутосомные раково-тестикулярные антигены (РТА). Они являются основными белками семенной жидкости человека; регулируют подвижность и созревание сперматозоидов. Помимо репродуктивных тканей, СГ1/2 экспрессируются в злокачественных новообразованиях, включая аденокарциному легкого, почечную карциному, а так же некоторые гембласты. Однако их биологическая роль в неопластических клетках в настоящее время не изучена.

Мы показали, что СГ1 и 2 часто экспрессируются на уровне белка в опухолевых клеточных линиях человека различного происхождения. При этом в зависимости от клеточной линии они могут иметь различную внутриклеточную локализацию. Используя биоинформатический анализ, мы продемонстрировали, что уровни экспрессии СГ1 и 2 отрицательно ассоциированы с выживаемостью онкобольных пациентов.

Мы создали клеточные модели рака легких, молочной и поджелудочной желез со стабильной сверхэкспрессией и нокаутом семеновелинов и продемонстрировали, что они способствуют снижению пролиферации, увеличению апоптоза и восприимчивости клеток к генотоксическим препаратам.

Чтобы идентифицировать белки-интерактанты семеновелинов, мы использовали метод GST pull-down в сочетании с последующей жидкостной хроматографией и масс-спектрометрией (LC-MS / MS). Всего мы идентифицировали 86 белков, ассоциированных с СГ1 и 2. Среди всех функциональных групп белков, мы сосредоточились на двух важных ферментах онко-ассоциированного метаболизма — LDHA и PKM2. Мы показали, что семеновелины повышают количество этих ферментов, а так же гликолиз, дыхание и продукцию АФК.

Таким образом, семеновелины повышают энергетический метаболизм исследуемых опухолевых моделей, но при этом обладают антипролиферационными свойствами и повышают их восприимчивость к генотоксическому стрессу.

Работа поддержана проектами РФФИ № 18-75-10076 и РФФИ № 18-315-20013.

Е.А. Щетникова, Е.Д. Вдовина, Г.С. Зыкова
**ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ ХРОМОСОМНЫХ
АБЕРРАЦИЙ У РАБОТНИКОВ
АЛЮМИНИЕВОГО ПРОИЗВОДСТВА
И У ЖИТЕЛЕЙ ПРИЛЕГАЮЩИХ К ЗАВОДУ
ТЕРРИТОРИЙ**

*Кемеровский государственный университет,
Институт биологии экологии и природных ресурсов,
Кемерово, Россия*

E.A. Shchetnikova, E.D. Vdovina, G.S. Zykova
**INCREASED LEVEL OF CHROMOSOMAL
ABERRATIONS IN ALUMINUM PRODUCTION
WORKERS AND RESIDENTS OF THE
TERRITORIES ADJACENT TO THE PLANT**

*Kemerovo state University. Institute of biology ecology
and natural resources, Kemerovo, Russia*

schetnikovakat@gmail.com

Соединения фтора — потенциально генотоксичны за счет сильных окислительных свойств элемента. Исследования подтвердили способность фторидов значительно увеличивать уровень повреждения ДНК и частоту хромосомных aberrаций в клеточных культурах, однако вопрос их генотоксическом воздействии на человека при сверхнормативной экспозиции остается открытым. Хронический контакт с фторсодержащими соединениями может вызывать тяжелую патологию — скелетный флюороз, влияние которого на частоту хромосомных нарушений так же малоизучено. Цель исследования — оценить частоту ХА в лейкоцитах крови у лиц, контактирующих с фтористым фактором, индуцируемым Новокузнецким алюминиевым заводом.

Материалом для исследования послужила периферическая венозная кровь 29 работников Новокузнецкого алюминиевого завода, с диагностированным заболеванием «костный флюороз», 15 работников без патологии, 23 человек постоянно проживающих в непосредственной близости от завода и 30 человек, проживающих в значительном отдалении от завода.

Цитогенетический анализ проводился на рутинной окраске путём оценки 200 метафазных пластинок лимфоцитов периферической крови. Измерение уровня фторид-иона в плазме крови было выполнено методом прямой потенциометрии. Сравнение частот переменных между группами проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

В результате исследования было отмечено, что у работников Новокузнецкого алюминиевого завода, больных скелетным флюорозом наблюдался повышенный уровень суммарной частоты ХА, по сравнению с рабочими без патологии [4,77[4,28–5,26] против, 3,15[2,50–3,81]], ($p < 0,05$). В целом у работников алюминиевого завода, не страдающих патологией, также наблюдается тенденция к увеличению суммарной частоты ХА по сравнению с жителями прилегающего района (3,15[2,50–3,81] против, 2,24[1,23–3,24]). По результатам измерения уровня фторид-иона в плазме крови работников алюминиевого производства было отмечено значимое повышение уровня фторид-иона в плазме работников завода, страдающих патологией ($4,47 \pm 1,17$ мг/л против, $3,12 \pm 1,84$ мг/л). Значимое увеличение частоты ХА у работников алюминиевого завода по сравнению с контрольными группами, может объясняться хронической экспозицией фторидами. Наблюдаемое увеличение ХА у рабочих с флюорозом по сравнению с рабочими без патологии вероятно объясняется повышенным содержанием в плазме крови фторид-иона, но нельзя исключить влияние патологических процессов. Повышенная концентрация фторид-иона у рабочих с патологией по сравнению со здоровыми работниками, логично объясняется характером патологического процесса.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Кемеровской области (№ 18-44-420012 р_а, соглашение с АКО № 8 от 28 июня 2018 г.), а также стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых № СП-2310.2018.4.

13 ОКТЯБРЯ 2020

ГЕНЕТИКА И БИОНФОРМАТИКАЕ.В. Большакова¹, А.Ф. Сайфитдинова^{1,2}**ПОИСК ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ НА РОЛЬ МИШЕНЕЙ РЕГУЛЯЦИИ ПОЛОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ У КУРИЦЫ**¹ Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия² Международный центр репродуктивной медицины, Санкт-Петербург, РоссияE.V. Bolshakova¹, A.F. Saifitdinova^{1,2}**THE SEARCH FOR CANDIDATE GENES TO BE TARGETED FOR REGULATION OF SEX DIFFERENTIATION IN CHICKEN**¹ The Herzen State Pedagogical University of Russia, Saint Petersburg, Russia² International Centre for Reproductive Medicine, Saint-Petersburg, Russia

bolshakovaaev@gmail.com

Несмотря на то, что для всех птиц доказано наличие генетического механизма определения пола с системой половых хромосом ZW, до сих пор не найдено конкретных генов, которые могут регулировать переключение половой дифференцировки [1]. В то же время, в составе половой хромосомы W у курицы (*Gallus gallus domesticus*) описан повторяющийся элемент (GGAAA)_n, который диспергирован в интерфазных ядрах и может участвовать в образовании регуляторных РНК [2]. Этот повтор был ранее описан в составе регулируемого промотора гена промежуточного нейрофиламент (NF-M) курицы [3]. В центральной нервной системе продукты данного гена могут принимать участие в формировании полового поведения.

Настоящее исследование посвящено поиску генов, в составе промоторных и регуляторных областей которых присутствует повторяющийся элемент (GGAAA)_n. В анализе использовалась последняя доступная сборка генома курицы GRCg6a (GCF_000002315.6); для поиска гомологии использовались инструменты BLAST и Unipro UGENE.

В результате исследования на хромосоме Z найден участок, содержащий 20 копий повтора (GGAAA) в составе интрона гена NRXN1 (Neuronal cell recognition molecule), а также участок, содержащий 36 копий повтора (GGGAA) в его 5' области. Ген NRXN1 кодирует мембранные белки нейрексины, которые являются продуктами трансляции различных мРНК, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Они функционируют преимущественно в пресинаптической мембране нейронов и отвечают за особенности социального поведения. Мы предполагаем, что этот ген может быть кандидатом на роль мишени регуляторных РНК, продуцирующихся с tandemных повторов половой хромосомы W. Тонкая регуляция может влиять на соотношение различных типов мРНК и участвовать в определении полового поведения самок.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 19-14-50096.

Литература:

1. Bellott DW et al. Nature Genetics. 2017; 49: 387–394

2. Komissarov, A. S. et al. Chromosoma. 2018; 127(1): 73–83.
3. Zopf D et al. Nucleic Acids Research. 1990; 18(3): 521–529.

Д.Д. Бондарук, Е.В. Голубкова, Л.А. Мамон, С.Ф. Кливер, В.Р. Гинанова

ОСОБЕННОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИНТРОНА В СОСТАВЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ NXF1 У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП

Санкт-Петербургский Государственный Университет, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Санкт-Петербург, Россия

D.D. Bondaruk, E.V. Golubkova, L.A. Mamon, S.F. Kliver, V.R. Ginanova

SPECIFIC INTRON FEATURES IN THE COMPOSITION OF THE NXF1 GENES SEQUENCES IN REPRESENTATIVES OF DIFFERENT TAXONOMIC GROUPS

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saint-Petersburg State University", Saint-Petersburg, Russian Federation

d.d.bondaruk@yandex.ru

Характерной особенностью гена *Nxf1* и его ортологов среди представителей группы *Opisthokonta*, принадлежащих к различным таксонам, является наличие интрон-сохраняющих транскриптов. Примечательно, что зачастую в сохраненном интроне содержится преждевременный стоп-кодон, за счет чего белок, соответствующий данному транскрипту, оказывается короче стандартного и может отличаться от него по вторичной структуре и набору функций. Содержащие преждевременный стоп-кодон транскрипты обычно подвергаются действию механизма NMD (nonsense mediated mRNA decay) на посттранскрипционном этапе, при этом интрон-сохраняющие транскрипты подлежат деградации. Интронсодержащие транскрипты гена *Nxf1* избегают NMD за счет специфических механизмов.

Так, у млекопитающих в интроне гена *Nxf1* показано наличие последовательности CTE (constitutive transport element), благоприятствующей экспорту транскрипта из ядра в цитоплазму.

Особенно примечателен тот факт, что сохраняющийся интрон входит в состав эволюционно-консервативного блока с фланкирующими экзонами длиной 110 п.н. и 37 п.н., схожего у представителей различных таксономических групп. Этот эволюционно-консервативный блок в наших предшествующих работах получил обозначение «кассетный интрон».

По нашим данным и данным наших коллег, укороченный вариант белка *Nxf1* имеет нейроспецифичные функции. Можно предположить, что различия в структуре кассетного интрона гена *Nxf1* могут рассматриваться в эволюционном плане.

Помимо CTE, в кассетном интроне млекопитающих присутствуют и другие консервативные последовательности, так начало интрона совпадало у всех рассматриваемых видов. У членистоногих, например,

дрозофилы, нет участков протяженной гомологии, характерных для млекопитающих, но присутствуют поли (A) протяженные последовательности, схожие с СТЕ в функциональном плане. Отмечены значительные отличия в строении кассетного интрона у нематод. Для рода *Caenorhabditis* характерны меньший размер интрон-экзонного блока, повышенное содержание тимина (Т) и отсутствие преждевременного стоп-кодона, также отсутствуют СТЕ-подобные последовательности. В отличие от представителей рода *Caenorhabditis*, у нематоды *Pristionchus pacificus* структура кассетного интрона имеет иной набор особенностей, и черты, характерные для рода *Caenorhabditis*, выражены лишь частично.

Структура кассетного интрона нематод, членистоногих и млекопитающих сохраняет общие черты, но при этом имеет свои, характерные для отдельных таксономических групп, отличительные особенности. Эти особенности строения могут быть использованы при анализе последовательностей кассетного интрона, для исследования вопросов, связанных с эволюцией генов и выявления механизмов сохранения интронов.

Грант РФФИ 19-04-01255 а: «Изучение влияния РНК-связывающего белка NXF1 на формирование и функционирование нервной системы».

Н.А. Буланцев¹, А.С. Комиссаров¹,
Е.И. Кошель¹, Е.Е. Круглов²,
Ю.В. Мякишева², Л.А. Кафтырева³

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ БИОПТАТОВ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

¹ Лаборатория прикладной геномики, SCAMT,
Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, Самара,
Россия

³ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени
Пастера, Санкт-Петербург, Россия

N.A. Bulantsev¹, A.S. Komissarov¹,
E.I. Koshel¹, E.E. Kruglov²,
YU.V. Myakisheva², L.A. Kaftyreva³

METAGENOMIC ANALYSIS OF COLON BIOPSY SAMPLES IN PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS

¹ Applied Genomics Laboratory, SCAMT Institute, ITMO
University, Saint Petersburg, Russia

² FSBEI HE SamSMU MOH Russia, Samara, Russia

³ Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg,
Russia

bulantsev@scamt-itmo.ru

Язвенный колит относится к группе мультифакториальных заболеваний с невыясненной этиологией. Предполагается, что нарушенный состав и сниженное разнообразие микробиоты кишечника являются факторами возникновения воспалительных заболеваний кишечника и влияют на их патогенез [1].

Актуальность данного исследования прописана развитием персонализированного подхода в медицине, проведением забора материала до медицинского вмешательства в протекание заболевания.

В исследовании принимали участие 25 пациентов с язвенным колитом, у которых были отобраны

биоптаты в пораженной и здоровой области толстой кишки. Секвенирование 16S рРНК проводилось на генетическом анализаторе HiSeq 2500. Метагеномные данные были классифицированы при помощи Kraken 2, проанализированы программой Pavian, визуализированы для сравнительного анализа в Recentrifuge.

Таксономический анализ выявил следующие изменения относительно 4 основных типов бактерий в биоптатах пораженной области толстой кишки по сравнению со здоровой: снижение Firmicutes на 2.43%, Proteobacteria на 2.70%, увеличение Bacteroidetes на 5.62%, Actinobacteria на 0.09%.

На следующем этапе исследования будет проведено сравнение имеющихся данных с базой образцов микробиоты здоровых людей, кроме этого, планируется увеличить размер выборки пациентов и разработать критерии оценки сравнения значений выборок в метагеномном анализе из-за индивидуальных различий микробиоты. Важными параметрами выбора метагеномной базы данных будут являться: особенности образцов, взятых для анализа: биопсия или кал; возраст исследуемых пациентов; метод секвенирования; используемый метагеномный пайплайн, количество образцов, забор биоптата с определенных отделов кишечника.

Литература:

1. Vrakas S, Mountzouris KC, Michalopoulos G, et al. PLoS One. 2017; 12(1): e0170034.

Н.В. Булатенко, А.С. Ефремова,
Т.Б. Бухарова, Н.В. Петрова,
Н.Ю. Каширская, Ю.Л. Мельяновская,
Е.И. Кондратьева, Д.В. Гольдштейн

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТАТОЧНОЙ ФУНКЦИИ ХЛОРНОГО КАНАЛА CFTR У ПАЦИЕНТА С ГЕНОТИПОМ CFTRDELE2,3/E403D НА МОДЕЛИ КИШЕЧНЫХ ОРГАНОИДОВ

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Медико-генетический
научный центр имени академика
Н.П. Бочкова», Россия, Москва

N.V. Bulatenko, A.S. Efremova, T.B. Bukharova,
N.V. Petrova, N.Y. Kashirskaya, Y.L. Melyanovskaya,
E.I. Kondratyeva, D.V. Goldstein

EXAMINATION OF RESIDUAL FUNCTION OF CFTR CHLORIDE CHANNEL OF THE PATIENT WITH CFTRDELE2,3/E403D GENOTYPE IN INTESTINAL ORGANOID MODEL

Research Center of Medical Genetics, Russia,
Moscow

bnv695@gmail.com

Муковисцидоз (МВ) является наиболее распространенным, опасным для жизни, аутосомно-рецессивным заболеванием. Варианты нуклеотидной последовательности в гене трансмембранного регулятора проводимости муковисцидоза (CFTR) приводят к нарушению синтеза цАМФ-зависимого хлорного канала CFTR или к образованию белка со сниженной функциональной активностью. На сегодняшний день зарегистрировано свыше 2000 генетических вариантов CFTR, большинство

из которых являются редкими. Частота варианта CFTRdele2,3 составляет 5% всех аллелей МВ, он относится к I классу. Редкий генетический вариант E403D (p.Glu403Asp, с.1209G>T) относится к миссенс мутациям, представляет собой замену глутаминовой кислоты на аспарагиновую в положении 1209 9-го экзона гена CFTR. На сегодняшний день данные о клинической значимости варианта E403D, а также о влиянии CFTR модуляторов на активность белка отсутствуют.

Цель: изучение функциональной активности канала CFTR и эффективности CFTR модуляторов у пациента с генотипом CFTRdele2,3/E403D.

Материалы и методы. Из биопатов толстого кишечника пациента была получена культура кишечных органоидов. Функциональную активность канала CFTR исследовали при помощи форсколинового теста. В качестве контролей использовали культуры кишечных органоидов, полученные от пациентов МВ с генотипами E92K/F508del и F508del/F508del и здоровых добровольцев.

Результаты. В анамнезе пациента 2013 г.р. с генотипом CFTRdele2,3/E403D и смешанной формой течения заболевания указаны хронический обструктивный бронхит, хроническая панкреатическая недостаточность, хроническая стафилококковая инфекция, интермиттирующий высев *Pseudomonas aeruginosa*, аллергический бронхолегочный аспергилез. Одним из маркеров патогенности вариантов нуклеотидной последовательности гена CFTR являются морфологические особенности органоидов, они неправильной формы, с утолщенными стенками и с редуцированным люменом. CFTRdele2,3/E403D органоиды внешне не отличаются от контрольных культур пациентов с МВ. Данные форсколинового теста указывают на полное нарушение проводимости канала CFTR. Эффекты корректора (VX-809) и потенциатора (VX-770), в отличие от контрольных образцов, не выявлены, что доказывает «тяжесть» исследуемого генотипа и его вариантов нуклеотидной последовательности.

Выводы. Было показано, что генетический вариант E403D — патогенный. Генотип CFTRdele2,3/E403D является «тяжелым» и не поддается коррекции существующими модуляторами CFTR.

В.Ю. Буслаев, В.И. Минина,
О.А. Соболева, В.Г. Дружинин

МИКРОБИОМ МОКРОТЫ И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TP53 У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЁГКОГО

ФГБНУ ФИЦ угля и углехимии СО РАН, Кемерово, Россия

V.Yu. Buslaev, V.I. Minina,
O.A. Soboleva, V.G. Druzhinin

MICROBIOME AND TP53 GENE POLYMORPHISM IN LUNG CANCER PATIENTS

Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russia

vladislabus2358@yandex.ru

Рак лёгкого (РЛ) относится к патологиям с наибольшим уровнем смертности [1]. В последние годы активно обсуждается роль генетической предрасположенности и специфики состава микробиома в развитии онкологических заболеваний. Целью настоящей работы является изучение особенностей микрофлоры мокроты в связи с полиморфизмом гена TP53 у больных РЛ.

В качестве материала для исследования было использовано по 23 образца мокроты и периферической крови, взятых у больных РЛ мужчин, а также 16 пар проб здоровых доноров. Генотипирование варианта гена TP53 в режиме реального времени производилось с использованием амплификатора CFX96 (BioRAD). Для изучения состава микрофлоры мокроты использовали высокопроизводительное секвенирование (MiSeq Illumina). Биоинформатический анализ выполняли с использованием ППП QIIME2. Статистическая обработка результатов осуществлялась средствами программы StatSoft STATISTICA 10 (модуль непараметрической статистики).

В результате проведения таксономической характеристики были получены процентные содержания бактериальных таксонов. При сопоставлении профилей микробиома в зависимости от полиморфизма гена TP53 был получен ряд значимых результатов (таблица).

Таблица. Сопоставление профилей микрофлоры (%) у обладателей различных вариантов G215C гена TP53 (rs1042522)

Таксон	Генотип		
	GG	GC	CC
Больные РЛ			
<i>Peptostreptococcus</i>	0	0,55 ± 0,93*	0
<i>Actinobacillus</i>	0,90 ± 1,37*	0	0
<i>Rothia terrae</i>	1,30 ± 2,00***	2,82 ± 2,82	9,50 ± 0,71**
<i>Bifidobacterium</i>	0	0,36 ± 0,92	0,50 ± 0,71***
Здоровые индивиды			
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0,18 ± 0,60	1,50 ± 1,29*	0
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,18 ± 0,40	2,25 ± 2,63*	0
<i>Treponema socranskii</i>	0	0,50 ± 0,58*	0

Примечание. Отличия (p<0,05): * GC vs GG; ** GC vs CC; *** GG vs CC Известно, что потеря активности белка p53 способствует снижению барьерной функции эпителия и может создавать условия для возникновения дисбиоза, что в свою очередь, инициирует развитие воспалительных реакций — важных факторов опухолеобразования [2]. Таким образом, взаимодействие гена TP53 и легочной микрофлоры, может являться одним из потенциальных механизмов, приводящих к формированию РЛ.

Исследование было поддержано грантом РФФИ 20-44-420012 p_a.

Литература:

1. Barta A., Powell C., Wisnevsky J. *Ann. Glob. Health.* 2019; 85(1): 1–16.
2. Greathouse K., White J., Vargas A. et al. *Genome biology.* 2018; 19: 123.

М.Е. Владимирова, В.С. Мунтян, М.Л. Румянцова **ГЕНОМНЫЕ ОСТРОВА *SINORHIZOBIIUM MELILOTI*, ВСТРОЕННЫЕ В ТРНК-THR(GGT)**

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Пушкин-8, Санкт-Петербург, Россия

M.E. Vladimirova, V.S. Muntyan, M.L. Roumiantseva **GENOMIC ISLANDS OF *SINORHIZOBIIUM MELILOTI* SITE-SPECIFICALLY INTEGRATED INTO THE TRNA-THR(GGT)**

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin-8, Saint Petersburg, Russia

mariivladimirova@mail.ru

Геномные острова (ГО) — генетические элементы, передающиеся между бактериями одного или разных видов посредством горизонтального переноса и сайт-специфически встраивающиеся по генам тРНК. Функциональное значение ГО определяется генами, входящими в их состав.

Проведен *in silico* анализ наличия ГО в хромосомах 26 штаммов азотфиксирующих симбионтов люцерны *Sinorhizobium meliloti* (GenBank), в числе которых три штамма, геномы которых были секвенированы (Illumina и Oxford Nanopore) и собраны (Unicycler) в рамках проекта РФФИ 17-16-01095. Всего выявлено 88 ГО, из которых 17 встроены в изоакцепторные тРНК-Thr. ГО референс штамма Rm1021 (Sme19T; 18.6 т.п.н.) также встроены в указанную тРНК (Румянцова и др. 2018).

Проанализированы нуклеотидные последовательности 10 ГО, встроенных в тРНК-Thr(GGT). Анализ Sme19T у родственных штаммов Rm1021 и Rm2011, которые хранятся в разных мировых коллекциях, показал их полную идентичность, тогда как в составе ГО (15.3 т.п.н.) штамма USDA1106, сходного с указанными штаммами (Epstein et al. 2018) отсутствовал фрагмент длиной 3 т.п.н. Анализ остальных 7-ми ГО показал: i-группа — ГО (13 т.п.н.) штамма KN46 содержал уникальные последовательности; ii-группа — ГО (12.7 и 17.6 т.п.н.) штаммов GR4 и M162 имели протяженные (0.7–3.1 т.п.н.) на 89% гомологичные блоки; iii-группа — ГО штаммов AK58, AK83, RU11/O1 и USDA1157, отличались от выше рассмотренных тем, что их протяженность была в 2.5 раза выше (48.0–50 т.п.н.). Кроме того, установлено, что 70% последовательностей ГО этих штаммов парно были гомологичны на 96%.

Проведен анализ OРС, выявленных в составе ГО. Показано, что в ГО iii-ей группы практически отсутствовали транспозазы IS-элементов, а OРС, относящихся к процессам хранения, обработки информации и защиты клетки, было в 2.5 раза меньше, чем в Sme19T. Более 17% OРС в их составе кодировали вирусные белки. В составе ГО ii-ой группы не выявлено OРС мобильных генетических элементов и фагов, однако более половины OРС задействовано в процессах репликации и репарации

ДНК, в метаболических процессах и в процессах защиты клетки, тогда как остальные кодировали гипотетические белки. В ГО, относящихся i-iii группам, элементы системы CRISPR/Cas не выявлены.

Таким образом, впервые проведен анализ последовательностей ГО, встроенных сайт-специфически в ген тРНК-Thr(GGT), у штаммов *S. meliloti*. Показано, что такие ГО могут иметь 100–82.3% гомологии у родственных штаммов, тогда как в случае генетически неродственных штаммов их гомология может достигать 70% как у штаммов одной популяции, так и между географически удаленными штаммами. Следовательно, при сайт-специфической интеграции в определенную тРНК вероятность встройки чужеродных последовательностей, имеющих до 70% гомологии может достигать 86%.

Работа была поддержана грантом РФФИ 20-16-00105 (биоинформатический анализ систем иммунитета бактерий), РФФИ 18-04-01278 (функциональный анализ OРС).

**Е.А. Ганцова^{1,2}, О.В. Серова^{1,2},
И.Е. Деев^{1,2}, А.Г. Петренко¹**

ГЕНЫ PH-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ, АКТИВИРУЕМЫЕ В ПОЧКАХ НОКАУТНЫХ ПО ГЕНУ *INSRR* МЫШЕЙ ПРИ ЩЕЛОЧНОЙ НАГРУЗКЕ

¹ Институт Биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² ИТУ «Сириус», Сочи, Россия

**Е.А. Gantsova^{1,2}, O.V. Serova^{1,2},
I.E. Deyev^{1,2}, A.G. Petrenko¹**

GENES OF PH-SENSITIVITY ACTIVATED IN THE KIDNEYS OF *INSRR* KNOCKOUT MICE UNDER ALKALOSIS

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

² Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

gantsova@mail.ru

Одним из сенсоров щелочного pH является рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR), член минисемейства рецептора инсулина, которое также включает рецептор инсулина и рецептор инсулиноподобного фактора роста. Наибольшее количество IRR было обнаружено в почке, где IRR экспрессируется в β -интеркалирующих клетках, выстилающих дистальные каналцы, которые секретируют бикарбонат. Для поиска новой клеточной модели для изучения pH-чувствительности, нами была получена на базе линии C57BL/6 уникальная линия нокаутных по гену *insrr* мышей. Отсутствие IRR может повлиять на чувствительность к pH главного экскреторного органа — почки. Для проверки этой гипотезы были взяты две линии мышей (дикий тип и нокаутные) в условиях щелочной нагрузки — в воду для питья животных добавляли 250 мМ NaHCO₃. Был проведен сравнительный анализ транскриптомов почек мышей дикого типа и нокаутных в нормальных условиях и в условиях экспериментального алкалоза при помощи широкомасштабного секвенирования. Были получены четыре набора данных об уровне экспрессии белков, которые были обчислены при помощи биоинформатических методов.

В результате были выявлены гены, сопряженные с экспрессией щелочного сенсора IRR и регулируемые экспериментальным алкалозом. Общие гены для нейтральных и щелочных условий, которые имеют наибольшую разницу экспрессии в разных типах мышей, были аннотированы и объединены в кластеры, которые составили несколько групп: рибосомальные гены (*rpl35*, *rpl29*, *rpl23*); митохондриальные гены (*mt-Nd1*, *mt-Cytb*, *mt-Nd6*, *chchd10*, *apoo*); остальные гены (*atn1*, *zfp3611*, *tnfsf12*, *fxyd1*, *clcc2d*). Различающиеся при алкалозе гены — *igf2 ccl27a*, *irs2*, *cys1*, в нейтральной среде — *fabp1*, *csf2ra*, *creb3l3*, *clcc6*. Были выделены гены, связанные с pH-чувствительностью — *slc51b*, *slc26a4*, *btc*, *slc16a1*.

Работа выполнена в рамках грантов РФФИ 19-34-90177, 19-04-01042, 19-34-51034, 18-04-01369.

Литература:

1. Deyev I. E. et al. Cell metabolism. 2011; 13(6): 679–689.
2. Petrenko A. G. et al. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. 2013; 1834(10): 2170–2175.

А.Г. Гринько¹, Е.И. Степченкова^{1,2}, Ю.И. Павлов³

ПОИСК ФАКТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ АКТИВНОСТЬ TLS ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ POL ζ НА НЕПОВРЕЖДЕННОЙ МАТРИЦЕ ДНК

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

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

³ Медицинский центр университета штата Небраска, Омаха, Небраска, США

A.G. Grinko¹, E.I. Stepchenkova^{1,2}, Y.I. Pavlov³

SCREENING FOR GENETIC FACTORS CONTROLLING ACTIVITY OF TLS DNA POLYMERASE POL ζ ON AN UNDAKAGED DNA

¹ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia,

² St. Petersburg branch of the N.I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, Saint Petersburg, Russia

³ University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA

alina.grinko.96@mail.ru

Спонтанные и индуцированные генотоксическими факторами повреждения ДНК могут блокировать репликацию и транскрипцию, что в свою очередь приводит к уменьшению жизнеспособности и даже гибели клетки. Для предотвращения негативного влияния повреждений ДНК на передачу и экспрессию генетической информации в клетках всех живых организмов реализуются различные программы ответа на повреждения ДНК, такие как, репарация или прямая коррекция повреждений. С развитием жизни на Земле, возникли дополнительные механизмы, которые позволяют снижать воздействие повреждений ДНК и направлены, главным образом, на преодоление блоков репликации. Один из таких механизмов заключается в смене основной репликативной ДНК-полимеразы Pol δ или Pol ϵ на специализированную ДНК-полимеразу, способную осуществлять синтез ДНК на поврежденных участках. Данный процесс называется TransLesion DNA Synthesis (TLS, синтез ДНК в обход

повреждения). TLS полимеразы обладают низкой точностью, поэтому нарушение регуляции их активности может приводить к увеличению частоты спонтанного мутагенеза, и как следствие, повышать риск наследственных, нейродегенеративных или онкологических заболеваний. Это определяет актуальность изучения факторов, участвующих в регуляции активности TLS ДНК-полимераз.

Ранее мы описали мутацию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae pol3-13*, которая нарушает взаимодействие [Fe-S] кластера с С-терминальным доменом каталитической субъединицы Pol δ , приводит к возрастанию частоты спонтанного мутагенеза и нарушению индуцированного мутагенеза, который зависит от TLS полимеразы Pol ζ . Эти данные говорят о том, что для привлечения высокоошибочной Pol ζ на поврежденную матрицу, необходим [Fe-S] кластер. Однако Pol ζ может привлекаться и на неповрежденную матрицу ДНК по механизму, который не зависит от [Fe-S] кластера, ассоциированного с С-терминальным концом Pol δ .

В данной работе мы осуществили поиск факторов, которые регулируют активность Pol ζ на неповрежденной ДНК. Для этого мы провели скрининг, направленный на поиск мутаций, снижающих частоту спонтанного мутагенеза на фоне *pol3-13*. В частности, мы оценили частоту возникновения прямых мутаций у штаммов дрожжей, несущих аллель *pol3-13*, совмещенную с мутациями по генам, которые как было показано ранее, участвуют в контроле индуцированного мутагенеза: *REV1*, *REV3*, *POL30*. Полученные результаты позволили нам сделать заключение, что привлечение неточной Pol ζ на неповрежденную матрицу частично зависит от структурной функции другой TLS ДНК-полимеразы Rev1, но не от ее каталитической активности, а также от моноубиквитинированного фактора процессивности PCNA и [Fe-S], ассоциированного с Pol ζ .

Таким образом, полученные нами данные подтверждают опубликованные нами данные о том, что активность неточной Pol ζ на поврежденной и неповрежденной матрицах регулируется посредством различных механизмов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-20-04-00663.

М.А. Даугавет¹, М.В. Грецова², О.И. Подгорная¹ ЦИСТЕИН-БОГАТЫЕ ПОВТОРЫ МОГУТ СЛУЖИТЬ ИНСТРУМЕНТОМ ДЛЯ ПОИСКА ГЕНОВ, ПЕРЕНЕСЕННЫХ ОТ ПРОКАРИОТ В ГЕНОМЫ ГРИБОВ И МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

М.А. Daugavet¹, M.V. Gretsova², O.I. Podgornaya¹ CYSTEINE-RICH REPEATS MAY HELP IN FINDING GENES TRANSFERRED FROM PROCARYOTES TO FUNGAL AND ANIMAL GENOMES

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

KaBtanka@yandex.ru

Горизонтальный перенос генов (ГПГ) — это передача генетической информации между неродственными

организмами. Этот процесс хорошо описан для прокариотических организмов. В то же время накоплено большое количество данных о случаях ГПГ от прокариот к эукариотам. В нашей предыдущей работе показано, что в белках эукариот встречается специфическая последовательность — цистеин-богатые повторы. Цистеин-богатые повторы, были обнаружены у грибов и многоклеточных животных, однако на основании наших данных не встречаются у архей, бактерий или вирусов.

Белки, содержащие цистеин-богатые повторы, часто так же содержат консервативные домены, типичные для прокариот или вирусов. Было выдвинуто предположение, что такие домены появились в результате горизонтального переноса. В данной работе для детального анализа был выбран белок гриба *Neocallimastix californiae*. Этот белок содержит цистеин-богатые повторы а так же два консервативных домена характерных для прокариот: гликозил-гидролаза семейства 25 и пептидаза M15A_C. Гликозил-гидролазный домен имеет достоверное сходство с ферментом бактерии рода *Clostridium* (E-value 3.4e-27), а так же с последовательностью из генома бактериофага *Clostridium* phage PHCTP1 (E-value 2e-24). Тогда как пептидазный домен имеет достоверное сходство с последовательностью бактерии рода *Bacteroides* (E-value 2.6E-33), а так же с последовательностью из генома бактериофага *Bacteroides* phage B124-14 (E-value 9e-14). Мы предполагаем, что обнаруженные бактерии могли являться донорами последовательностей, кодирующих отдельные домены, а бактериофаги векторами их переноса в эукариотический геном. Таким образом, на примере белка *N. californiae*, содержащего цистеин-богатые повторы, можно проследить события горизонтального переноса последовательностей, кодирующих отдельные домены.

Среди всех белков, содержащих цистеин-богатые повторы, для 86 доменов удалось найти близкое сходство с бактериальными последовательностями. Из них для 60 так же наблюдается достоверное сходство с вирусными последовательностями. Белки, содержащие эти домены, принадлежат грибам и многоклеточным животным. Грибы относятся к таксономическим группам Ascomycota, Basidiomycota и Chytridiomycota. Среди многоклеточных животных присутствуют представители Mollusca, Crustacea, Brachiopoda, Echinodermata, Chordata и Placozoa.

Таким образом, цистеин-богатые повторы белков эукариот во многих случаях ассоциированы с доменами прокариотического происхождения. Эта закономерность прослеживается для большого разнообразия организмов. Однако роль самих повторов пока остаётся неизвестной.

Работа выполнена в рамках грантов РФФИ (19-74-20102), РФФИ (19-34-80032), при поддержке совета по грантам при президенте РФ.

В.А. Дикая¹, А.О. Травина², Д.И. Остромышенский², О.И. Подгорная², А.С. Комиссаров¹

АНАЛИЗ СОСТАВА ТРАНСКРИПТОМА ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ *RANA TEMPORARIA*

¹ Лаборатория прикладной геномики, SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия
² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

V.A. Dikaya¹, A.O. Travina², D.I. Ostromyshenskiy², O.I. Podgornaya², A.S. Komissarov¹

TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF GRASS FROG *RANA TEMPORARIA*

¹ Applied Genomics Laboratory, SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg, Russia
² Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

dikaya@scamt-itmo.ru

Изучение стадии оогенеза на опытах по клонированию показало, что репрограммирование генома зависит от составов ооплазмы и нуклеоплазмы. В результате сравнения транскриптомов ядра *X. laevis* (без кариосферы) и ооплазмы было выявлено, что в ооплазме преобладают белок-кодирующие гены, в нуклеоплазме — транскрипты повторов. Многие повторы ДНК активно транскрибируются в раннем эмбриогенезе при активации родительского генома и при их ингибировании дальнейшее развитие эмбриона невозможно. Предполагают, что адгезивность tandemных повторов играет ключевую роль при перемещении хромосомных территорий в интерфазном ядре.

Объектами данного исследования были выбраны ооциты травяной лягушки, ввиду их большого размера и наличия кариосферы, содержащей хромосомы, окруженные белковой капсулой, что удобно для выделения и последующей локализации транскриптов. В настоящей работе поставлена задача качественного и количественного анализа состава транскриптома с акцентом на наличие повторяющихся элементов.

Полученная на основе выделенной РНК кДНК секвенирована на Illumina HiSeq 2500, было получено 11 552 749 парных ридов. Риды были очищены от адаптеров и оптических дубликатов, после чего собраны с помощью программы Trinity. В собранном транскриптоме проаннотировано с помощью Trinotate 3961 или 14.6% последовательностей соответственно. Большинство (93.48%) несобранных ридов локализованы в черновой версии сборки генома *R. temporaria* (NCBI assembly: GCA_009802015.1) с помощью программы STAR. Дополнительно мы сравнили все собранные контиги с базой данных NCBI Nucleotide, но только для 4078 последовательностей найдено совпадение (9.91%). В ходе анализа данных обнаружили, что несмотря на присутствие в черновой сборке генома, большинство транскриптов отсутствует в нуклеотидных базах данных. Были найдены повторы (сателлитная ДНК) размерами от 5 до 114 Mb с наиболее высокой частотой встречаемости, большинство из них не описаны в базах данных, кроме CR1 и мажорного сателлита S1a. Высокая копияность двух повторов представлена в ридов различных данных. В настоящее время благодаря полученным результатам были выбраны олигонуклеотиды для картирования FISH и RNA-FISH, в дальнейшем планируется детальное аннотирование повторов.

А.С. Жук¹, А.Э. Романович²,
Е.И. Степченкова^{2,3}, С.Г. Инге-Вечтомов^{2,3}

**МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ НАРУШЕНИЙ
ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА У ДРОЖЖЕЙ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕПОРТЕРНОЙ
СИСТЕМЫ *PMFA1-GFP* И ПРОТОЧНОЙ
ЦИТОМЕТРИИ**

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Санкт-Петербургский филиал института общей
генетики им. Н.И. Вавилова, РАН, Санкт-Петербург,
Россия

A.S. Zhuk¹, A.E. Romanovich²,
E.I. Stepchenkova^{2,3}, S.G. Inge-Vechtomov^{2,3}

**FLUORESCENCE DETECTION OF GENOME
INSTABILITY BY *PMFA1-GFP* REPORTER
AND FLOW CYTOMETRY IN YEAST
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

¹ ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint-Petersburg,
Russia

³ Vavilov Institute of General Genetics, Saint-Petersburg
Branch, Russian Academy of Sciences, Saint-
Petersburg, Russia

ania.zhuk@gmail.com

Разработка новых и совершенствование существующих методов выявления генетических нарушений является актуальной задачей как для изучения фундаментальных механизмов мутагенеза и дестабилизации генома, так и для выявления потенциальной мутагенной активности новых лекарственных средств, пищевых добавок и др. Разрабатываемый нами метод выявления генетических нарушений различных типов основан на особенностях переключения типов спаривания $\alpha \rightarrow a$ у гетероталлических дрожжей *S.cerevisiae* и представляет собой усовершенствованный альфа-тест. Гаплоидные клетки дрожжей могут быть двух типов спаривания: a или α . В норме только клетки противоположных типов a и α могут скрещиваться. Клеточный тип α или a находится под контролем локуса *MAT α* и *MAT a* , соответственно. При нарушении экспрессии локуса *MAT α* клетка α типа спаривания переключает свой тип спаривания на противоположный, приобретая фенотип a , и способность скрещиваться с другими α клетками. В альфа-тесте переключение типа спаривания $\alpha \rightarrow a$ фиксируют по образованию гибридов двух штаммов одинакового типа спаривания α на селективной среде. Повышение частоты переключения типа спаривания $\alpha \rightarrow a$, вызванного повреждением локуса *MAT α* , отражает уровень дестабилизации генома при воздействии мутагеном. Альфа-тест позволяет выявлять широкий спектр генетических нарушений, как наследственные изменения различных типов (генные мутации, потери хромосом и ее плеча, рекомбинационные события), так и временные (предмутационные) изменения генетического материала.

В данной работе мы предложили способ усовершенствования процедуры тестирования, направленный на снижение доли ручного труда при проведении альфа-теста. Для выявления нарушений генетического материала, способных приводить к переключению типа спаривания $\alpha \rightarrow a$, мы предлагаем использовать систему репортерного гена *GFP* под контролем промотора

a-специфичного гена *MFA1* и с помощью проточной цитометрии проводить оценку частоты клеток, переключивших тип спаривания $\alpha \rightarrow a$, по наличию флюоресценции *GFP*. Мы подтвердили эффективность этого подхода с использованием генотоксического вещества камптотецина. Предложенные нами модификации альфа-теста дают возможность сократить объем питательных сред для культивирования дрожжей и ручного труда при проведении тестирования, что позволит в дальнейшем использовать предлагаемую тест-систему как экспресс-метод для быстрого выявления потенциальной мутагенной активности различных веществ.

Работа выполнена при государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации в рамках программы ITMO Fellowship and Professorship Program, РФФИ 18-34-00130 мол_а и реурсного центра «РМИКТ» научного парка СПбГУ.

А.А. Жукова¹, В.А. Володькина²,
А.Г. Демин³, М.М. Кулак², О.А. Павлова⁴,
С.А. Галкина², А.Ф. Сайфитдинова^{1,4}

**КЛАСТЕР ГЕНОВ РРНК У ЯПОНСКОГО
ПЕРЕПЕЛА (*COTURNIX JAPONICA*)**

¹ Российский государственный педагогический
университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург,
Россия

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

³ Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского Минздрава РФ,
Саратов, Россия

⁴ Международный центр репродуктивной медицины,
Санкт-Петербург, Россия

A. Zhukova¹, V. Volodkina², A. Dyomin³, M. Kulak²,
O. Pavlova⁴, S. Galkina², A. Saifitdinova^{1,4}

JAPANESE QUAIL RRNA GENE CLUSTER

¹ Herzen State Pedagogical University of Russia,
Saint-Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint-Petersburg,
Russia

³ Saratov State Medical University named after
V.I. Razumovsky, Saratov, Russia

⁴ International center of reproductive medicine,
Saint-Petersburg, Russia

gatteriyagreen@gmail.com

Повторяющиеся кластеры генов рРНК (18S, 5.8S, 28S) составляют чрезвычайно важную часть генома, так как уровень их активности влияет на образование ядрышек, где осуществляется сборка субъединиц рибосом, а также контроль белков, регулирующих клеточный цикл. Несмотря на интенсивные исследования геномов птиц, полная информация об организации кластера генов рРНК есть только для курицы *Gallus gallus* [1]. Цитогенетическими методами было показано наличие трех пар ядрышкообразующих хромосом в кариотипе японского перепела *Coturnix japonica* в отличие от большинства птиц, имеющих только одну пару таких хромосом. Цель настоящего исследования — поиск в доступных базах данных последовательностей, относящихся к кластеру генов рРНК *C.japonica* и их сборке в полную последовательность.

Для анализа были использованы контиги полногеномного секвенирования *C. japonica* (NCBI: LSZSO1004495.1, LSZSO1002975.1, LSZSO1001001.1), последовательность гена 18S *Coturnix pectoralis* (AF173611.1), а также полученные нами клонированные и секвенированные последовательности, содержащие фрагменты гена 18S рНК *C. japonica*. В работе использовали инструменты BLAST, Homology segment analysis и Geneious.

В результате работы был собран фрагмент длиной 4094 п.н. (18S — 1777 п.н., ITS1 — 2160 п.н., 5,8S — 157 п.н.). Для определения границ между генами и внутренними транскрибируемыми спейсерами использовали выполненную ранее сборку рДНК домашней курицы (KT445934). Расшифровка полной последовательности кластера рДНК японского перепела усложнена из-за большого количества повторов, насыщенных GC-парамии. Полученные данные необходимы для создания консенсусной последовательности, которая позволит в будущем собрать кластеры, локализованные на разных хромосомах.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-14-50096.

Литература:

1. Dyomin A.G. et al. PLoS ONE. 2016; 11(6): e0157464.

**А.К. Какойченкова^{1,2}, И.В. Жильцов^{1,2},
К.Л. Дедюля², Ю.Н. Орловский¹, А. Бауэр⁴,
Й. Хохаизель⁴, П.В. Назаров³**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЕКОНВОЛЮЦИИ ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ ДЛЯ ОЦЕНКИ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ СИГНАЛОВ У ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

² СООО «Nativita», Минск, Беларусь

³ Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

⁴ German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

**А.К. Kakoichankava^{1,2}, I. Zhyltsou^{1,2},
Y. Arlouski¹, Konstantin Dedyulya⁴, A.S. Bauer⁴,
Jörg D. Hoheisel², P.V. Nazarov³**

DECONVOLUTION OF TRANSCRIPTOMIC DATA SHOWS BIOLOGICALLY AND CLINICALLY RELEVANT SIGNALS IN PANCREATIC TUMOR

¹ Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

² «Nativita», Minsk, Belarus

³ Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

⁴ German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

kakoichenkova95@gmail.com

Рак поджелудочной железы является одним из самых агрессивных новообразований в мире. В среднем пятилетняя выживаемость при раке поджелудочной железы колеблется от 5 до 7% [1]. Специфической этиологии для неоплазии в ткани поджелудочной железы в настоящий момент времени, не выявлено. Однако, ряд исследований демонстрирует, что предрасполагающими факторами для развития рака поджелудочной железы являются: курение, злоупотребление алкоголем, сахарный диабет,

ожирение,отягощенный наследственный анамнез, хронический панкреатит [1]. Молекулярный ландшафт рака поджелудочной железы характеризуется высокой гетерогенностью, что возможно, обуславливает ее способность к ускоренному росту, развитию химиотерапевтической резистентности, инвазии и метастазированию. Среди наиболее распространенных мутаций в образцах PDAC (pancreatic adenocarcinoma — аденокарцинома поджелудочной железы) наиболее часто выявлялись нарушения в генах KRAS, TP53, SMAD4, CDKN2A, TGFBR1,2 и др [1,2].

В нашей работе было проанализировано 736 транскриптомов рака поджелудочной железы из трех баз данных (TCGA — 183, Bailey — 96, DKFZ — 457 образцов соответственно). Для оценки клинически значимых сигналов опухоли, коррелирующих с показателями выживаемости пациентов использовался метод независимых компонент (ICA — independent component analysis), который разделяет сложные сигналы с нормальным распределением на множество статистически независимых сигналов [3]. Анализ данных осуществлялся в режиме динамического программирования при помощи R-Studio. Для проведения ICA использовался пакет consICA (<https://gitlab.com/biomodlii/consica>).

В результате исследования были получены отдельные компоненты, отражающие экспрессию генов, регулирующих физиологические процессы в опухоли поджелудочной железы а также соответствующие различным клеточным типам (раковым, иммунным, клеткам стромы). Был проведен анализ выживаемости с помощью регрессии Кокса и получены кривые Каплана-Майера для каждой компоненты, которые позволили изучить их влияние на выживаемость среди пациентов с раком поджелудочной железы. Анализ сигнальных путей и процессов активированных таковыми проводился с использованием ресурса функциональной аннотации Enrichr.

Было установлено, что активация клеточного цикла, неоангиогенез, пролиферация соединительной ткани, кератинизация и активация ERK-сигнального пути отрицательно коррелирует с выживаемостью у групп пациентов. Положительно влияет на выживаемость сохранение нормальной секреторной активности поджелудочной железы. Влияния таких факторов, как иммунный ответ, пол, нейрогенез на выживаемость пациентов установлено не было.

Работа была выполнена в рамках гранта C17/BM/11664971 «DEMICS» при поддержке Luxembourg Institute of Health, Luxembourg.

В.С. Камарян¹, А.Т. Макичян¹, Е.А. Попугаева²,
Д.П. Чернюк², Л.С. Унанян¹

**ДОКИНГ И КОНФОРМАЦИОННЫЙ
АНАЛИЗ ПРОИЗВОДНОГО ПИПЕРАЗИНА
ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО
ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ
АЛЬЦГЕЙМЕРА**

¹ Российско-Армянский Университет, Институт
биомедицины и фармации, Ереван, Армения

² Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого, лаборатория молекулярной
нейродегенерации, Санкт-Петербург, Россия

V.S. Kamaryan¹, A.T. Makichyan¹, E.A. Popugayeva²,
D.P. Chernyuk², L.S. Unanyan¹

**DOCKING AND CONFORMATION
ANALYSIS OF THE PIPERASIN DERIVATIVE
OF A POTENTIAL THERAPEUTIC DRUG FOR THE
TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE**

¹ Russian-Armenian University, Institute of Biomedicine
and Pharmacy, Erevan, Armenia

² Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic
University, St Petersburg, Russia

lena.popugayeva@gmail.com, lernik.hunanyan@rau.am

Болезнь Альцгеймера (БА) — это нейродегенеративное заболевание, поражающее в большинстве случаев людей преклонного возраста, отличительной чертой которого является прогрессирующая потеря памяти, вызванной синаптической дисфункцией. Настоящая работа основана на кальциевой гипотезе нейродегенеративных заболеваний [1]. В данной работе представлены результаты исследований взаимодействия биоактивных соединений производных пиперазина (ПП) на неселективные кальциевые каналы TRPC6, которые вовлечены в процесс патогенеза БА. Ранее было показано, что ПП и, в частности, 51164, который был взят из базы данных IBS (г. Черноголовка, Россия), является потенциальным активатором TRPC6 [2]. В качестве контроля был использован гиперфорин взятый из базы данных PubChem (CID:441298). Трехмерную структуру TRPC6 взяли из UniProt с номером KB: Q9Y210. Докинг анализ проводился с использованием AutoDock Vina [3]. Полученные пространственные и энергетические параметры взаимодействия свидетельствуют, что гиперфорин и 51164 взаимодействуют с активным центром (АЦ) белка TRPC6 с энергиями связывания $-7,7 \pm 0,38$ и $-7,1 \pm 0,35$ ккал/моль соответственно. Были рассчитаны значения констант связывания для обоих взаимодействий, которые равны $4,6 \times 10^5$ для гиперфорина и $1,7 \times 10^5$ для 51164. Полученные результаты конформационного анализа свидетельствуют, что у 51164 взаимодействия несет гидрофобный характер, когда у гиперфорина наблюдается единичные водородные связи с аминокислотными остатками ILE613, ASN617.

Работа поддержана грантом РФФ № 20-75-10026.

Литература:

1. Khachaturian, Z. S. (1989). Ann NY Acad Sci 568: 1–4.
2. Popugayeva, E., D.Chernyuk, et al. (2019). Mol Pharmacol 95(4): 337–348.
3. Trott O. & Olson A. J. (2010), J Comput Chem. 31(2): 455–461.

О.Л. Кантидзе

**МЕТОДЫ ГЕНОМИКИ И МИКРОСКОПИИ
СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ КАК
ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
3D-ГЕНОМА**

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

O.L. Kantidze

**GENOMICS AND SUPER-RESOLUTION
MICROSCOPY METHODS AS TOOLS FOR 3D
GENOME RESEARCH**

Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russia

kantidze@gmail.com

В течение последних двух десятилетий были определены детальные принципы иерархической укладки хромосом эукариот. Наряду со структурами, составляющими трехмерную (3D) геномную организацию (хроматиновые компартменты, топологически ассоциированные домены, хроматиновые петли и т. д.), были идентифицированы и исследованы молекулярные механизмы, участвующие в их установлении и поддержании. При этом, основное внимание было сосредоточено на исследовании специфических ДНК-белковых и белок-белковых взаимодействий. Однако, становится все более очевидным, что сегрегации хромосом на структурные и функциональные единицы способствуют слабые взаимодействия, обусловленные, в частности, явлением жидкостного разделения фаз (liquid-liquid phase separation, LLPS). В этой работе, используя методы геномики (Hi-C) и микроскопии сверхвысокого разрешения (STORM и SIM) была исследована роль LLPS в поддержании трехмерной организации генома. Было показано, что наибольший вклад в пространственную организацию генома LLPS вносит на уровне хроматиновых компартментов и энхансер-промоторных взаимодействий. В целом, необходимо отметить, что полученные результаты свидетельствуют о достаточно ограниченном вкладе LLPS в трехмерную организацию генома в живых клетках.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 17-00-00098.

**М.Н. Карагяур, М.Г. Гладкова, М.Н. Скрябина,
С.С. Джауари, Е.В. Семина, А.Ю. Ефименко,
К.Ю. Кулебякин, П.А. Тюрин-Кузьмин, В.А. Ткачук**
**МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНОМИКА: СОВРЕМЕННОЕ
СОСТОЯНИЕ И ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ**

*Институт Регенеративной Медицины, Медицинский
научно-образовательный центр МГУ имени
М.В. Ломоносова*

*Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ МГУ
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
Факультет Биоинженерии и Биоинформатики ФГБОУ
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
НМИЦ Кардиологии Минздрава РФ, Москва, Россия*

**M.N. Karagyaour, M.G. Gladkova, M.N. Skryabina,
S.S. Dzhauari, E.V. Semina, A.Yu. Efimenko,
K.Yu. Kulebyakin, P.A. Tyurin-Kuzmin, V.A. Tkachuk**
**MEDICAL GENOMICS: CURRENT SITUATION
AND DEVELOPMENT TRENDS**

*Institute of Regenerative Medicine, Medical Research
and Education Center of Lomonosov Moscow State
University*

*Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow
State University, Moscow, Russia
Faculty of Bioengineering and Bioinformatics,
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
National Medical Research Center of Cardiology of the
Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
Moscow, Russia*

m.karagyaour@mail.ru

Медицинская геномика играет ключевую роль в установлении взаимосвязи геномных вариантов и мутаций с предрасположенностью к возникновению болезни, ее течению и индивидуальной чувствительностью к лекарственным препаратам. Клеточные культуры и гуманизированные животные модели в сочетании с геномными технологиями стали факторами ее быстрого прогресса. С помощью технологий рекомбинантных ДНК и систем редактирования генома были установлены генетические причины развития множества наследственных заболеваний (спинальная мышечная атрофия, хроническая гранулематозная болезнь и пр.).

В нашей лаборатории с использованием ряда клеточных и животных моделей с выключенными генами *Plaur*, *Duox2* удалось установить связь между дисфункцией данных генов и развитием ряда патологий. При этом knock-out модели являются достаточно грубым инструментом и не способны отразить все нюансы молекулярных механизмов развития заболевания. Современные разновидности технологий редактирования генома позволяют моделировать отдельные SNP, как самую распространенную форму генетической изменчивости в развитии патологий. Еще одним вызовом для медицинской геномики является изучение роли некодирующих областей генома в развитии заболеваний.

В соответствии с этими тенденциями в нашей лаборатории разрабатываются технологические подходы, позволяющие изучать функциональную роль отдельных SNP и некодирующих РНК.

Развитие медицинской генетики, в том числе и с использованием экспериментальных методов, будет способствовать разработке новых терапевтических подходов и приблизит наступление эры персонализированной медицины.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского фонда фундаментальных исследований — проект № 18-015-00535. В работе были использованы коллекции клеток и генетических конструкций, собранных и сохраняемых в рамках проекта «Ноев ковчег», и оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Д.В. Качкин^{1,2,3}, А.А. Зелинский^{1,2},
Ю.И. Хорольская⁴, К.Ю. Куличихин¹,
А.А. Рубель^{1,2,3}, Ю.О. Чернов^{1,5}**

**ИЗУЧЕНИЕ АГРЕГАЦИИ БЕЛКА
PHC3 В КЛЕТКАХ МИКРООРГАНИЗМОВ
И ЧЕЛОВЕКА**

¹ Научная лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, России

³ Научно-Технологический Университет Сириус, Сочи, Россия

⁴ Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

⁵ School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

**D.V. Kachkin^{1,2,3}, A.A. Zelinski^{1,2}, J.I. Khorolskaya⁴,
K.Y. Kulichikhin¹, A.A. Rubel^{1,2,3}, Y.O. Chernoff^{1,5}**

**STUDY ON THE AGGREGATION
OF PHC3 PROTEIN IN MICROBIAL AND HUMAN
CELLS**

¹ Laboratory of Amyloid Biology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

² Genetics and Biotechnology Department, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

³ Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

⁴ Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia

⁵ School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

pspdaniel@mail.ru

Амилоиды — упорядоченные белковые агрегаты фибриллярной природы, которые формируются за счет образования межмолекулярных кросс-бета структур. Особый интерес к амилоидам связан с тем, что они ассоциированы с целым рядом неизлечимых заболеваний человека, наиболее известными из которых являются болезни Альцгеймера и Паркинсона, диабет II типа, прионные заболевания. Наряду с патогенными амилоидными белками, в последние годы появляется все больше данных о функциональных амилоидах, которые выполняют важные биологические функции у различных организмов

В ходе исследований, проведенных с использованием оригинальной дрожжевой тест-системы [1] был выявлен ряд потенциально амилоидогенных белков млекопитающих, включая короткие изоформы 5 и 6 белка PHC3 человека. Амилоидная агрегация коротких изоформ белка PHC3 была подтверждена с помощью биохимических и цитологических методов в клетках дрожжей, а также в бактериальных культурах с использованием системы C-DAG [2]. В ходе данной работы мы показали,

что короткие изоформы белка РНСЗ, слитые с флуорофором, формируют детергент-устойчивые цитоплазматические агрегаты при сверхпродукции в культуре клеток человека НЕК293Т. С использованием РНСЗ антител было показано что при агрегации укороченных изоформ, полноразмерный белок РНСЗ колокализует с агрегатами и преимущественно накапливается в цитоплазме.

Полноразмерный белок РНСЗ является одним из ключевых компонентов поликомб группы (PcG) — комплекса, модулирующего укладку хроматина и необходимого для поддержания репрессированного состояния многих генов, включая Нох-гены во время развития организма. Функции коротких изоформ РНСЗ до настоящего времени не были известны. Наши данные указывают, что агрегация коротких изоформ белка РНСЗ может сопровождаться секвестрированием в агрегаты его полноразмерной изоформы, что приводит к перемещению части белка РНСЗ из ядра в цитоплазму. Мы предполагаем, что это может влиять на активность поликомб комплекса укладку хроматина и уровень экспрессии ряда генов. Таким образом, короткие амилоидогенные изоформы белка РНСЗ могут регулировать его биологическую активность. В настоящее время ведутся исследования, направленные на проверку данной гипотезы.

Работа была поддержана грантами РФФИ № 19-34-51054, № 19-34-90153 и СПбГУ ID 51140332, а также при поддержке ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС», «Биобанк» и «РМИКТ» Научного парка СПбГУ.

Литература:

1. Chandramowlishwaran P. et al., J. Biol. Chem. 2018; 293(9): 3436–3450.
2. Sivanathan V., Hochschild A. Nat. Protoc. 2013; 8(7): 1381–90.

Е.С. Клушевская, Н.А. Чуриков

АНАЛИЗ МЕЖХРОМОСОМНЫХ КОНТАКТОВ ЯДРЫШЕК С ГЕНАМИ *DUX4* ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ FISH

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии наук, Москва, Россия

E.S. Klushevskaya, N.A. Tchurikov

ANALYSIS OF INTERCHROMOSOMAL CONTACTS OF NUCLEOLI WITH *DUX4* GENES IN HUMAN CHROMOSOMES USING FISH

Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

giedre@inbox.ru

Хроматин обладает динамичной структурой, которая регулируется в ответ на внутренние и внешние стимулы клетки. В нормально функционирующей клетке постоянно происходит синтез белковых молекул, для чего необходимо достаточное количество рРНК. В клетках млекопитающих множественные копии генов рРНК расположены последовательно и разделены межгенными спейсерами. Основные сигнальные пути, влияющие на рост и развитие клетки, регулируют в первую очередь скорость синтеза рРНК. В настоящее время хорошо изучены внутрихромосомные взаимодействия, но появляются данные о возможности межхромосомных взаимодействий и их значимости в регуляции активности генов.

Изменение состояния хроматина кластеров генов рРНК может инициировать репрессию или активацию транскрипции в определенных районах хромосом, что позволяет предполагать участие контактов рДНК в регуляции активности генов. Методом 4С, который дает возможность определять взаимодействующие участки генома, было обнаружено, что кластеры рДНК контактируют со специфическими областями разных хромосом, в том числе с генами *DUX4* человека. Оказалось, что контакты генов рРНК с генами *DUX4* пропадают при тепловом шоке. Гены *DUX4* кодируют транскрипционные факторы, необходимые только на стадии двух бластомеров. Их экспрессия на более поздних стадиях приводит к одному из видов мышечной дистрофии. Методами флуоресцентной гибридизации (FISH) были определены места межхромосомных контактов и их частоты в норме и при тепловом шоке. Пробы ДНК генов рРНК метили Alexa-3, а генов *DUX4* — Alexa-5. Обнаружено, что на клетку приходится около 10 фокусов гибридизации зонда *DUX4*. При тепловом шоке число контактов генов *DUX4* с ядрышками уменьшается почти в 2 раза. Общее число фокусов гибридизации пробы *DUX4*, приближенных к ядрышку, не изменяется. При тепловом шоке возрастает среднее расстояние между фокусами гибридизации проб рРНК и *DUX4*. Модальное значение расстояния между генами *DUX4* и ядрышками увеличивается и повышается доля мест гибридизации генов *DUX4*, не связанных с областью гибридизации пробы рРНК. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что при тепловом шоке гены *DUX4* дистанцируются от ядрышек. Результаты экспериментов согласуются с данными, полученными методом 4С и позволяют выявить разнообразие контактов в отдельных клетках.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ № 18-14-00122.

В.В. Козин¹, А.Ю. Шалаева¹, А.И. Кайров¹, И.Е. Борисенко¹, К.В. Халтурин², Р.П. Костюченко¹
ГЕНОМНЫЙ, ТРАНСКРИПТОМНЫЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КАНОНИЧЕСКОГО WNT-СИГНАЛИНГА У НЕРЕИДНЫХ ПОЛИХЕТ

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

² Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University, Окинава, Япония

V.V. Kozin¹, A.Yu. Shalaeva¹, A.I. Kairov¹, I.E. Borisenko¹, K.V. Khalturin², R.P. Kostyuchenko¹
GENOMIC, TRANSCRIPTOMIC, AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF CANONICAL WNT SIGNALING IN NEREID POLYCHAETES

¹ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

² Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University, Okinawa, Japan

v.kozin@spbu.ru

Сигнальный путь Wnt хорошо известен в качестве наиболее консервативного и мультифункционального регулятора жизнедеятельности многоклеточных животных. Участие Wnt в разметке осей зародыша, управлении клеточной судьбой, миграцией и пролиферацией делает его незаменимым инструментом индивидуального

и эволюционного развития [1]. Для всестороннего понимания этих процессов крайне важно изучать модели с уникальными свойствами, приобретенными в разных филогенетических линиях. Среди таких свойств у кольчатых червей следует отметить наличие невероятно консервативного паттерна раннего развития в сочетании с большим разнообразием планов строения сегментированного тела. Участвует ли канонический сигналинг Wnt в реализации этих признаков мы проверили с помощью комплексного анализа геномной организации, экспрессии и экспериментального подавления его компонентов у полихет *Alitta virens* и *Platynereis dumerilii*.

В геноме nereid был обнаружен наиболее полный набор из 12 недуплицированных генов Wnt, 4 из которых организованы в консервативный кластер. По транскриптомным данным, все эти гены дифференциально экспрессируются у растущих и регенерирующих червей, преимущественно в заднем конце тела. С помощью фармакологических ингибиторов и изучения морфологических признаков, паттернов пролиферации и экспрессии генов-мишеней нами впервые были получены согласующиеся между собой доказательства участия Wnt в контроле над морфогенезом, сегментацией и клеточной дифференциацией на различных стадиях развития и регенерации *A. virens*. На ранних этапах эмбриогенеза мы обнаружили асимметричное распределение β -катенина в ассоциации с центросомами, что указывает на уникальный способ Wnt-зависимой спецификации сестринских бластомеров при спиральном дроблении.

Работа выполнена на базе морской биологической станции СПбГУ (УНБ «Беломорская»), РЦ ММ и РЦ РМикТ СПбГУ при поддержке грантов РФФ № 17-14-01089 (биоинформационный анализ) и РФФИ № 18-04-01335 (анализ развития мезодермы).

Литература:

1. Козин В.В., Борисенко И.Е., Костюченко Р.П. Изв. РАН. Сер. биол. 2019; 1: 19–30.

А.П. Козлова^{1,2}, В.С. Мунтян¹, Е.А. Дзюбенко³,
А.М. Афонин¹, М.Л. Румянцева¹

НОВАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ ФОРМА РИЗОФАГА 16-3 ИЗ ПОЧВ КАВКАЗА

¹ Всероссийский Научно-исследовательский
Институт Сельскохозяйственной Микробиологии,
Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный
Технологический Институт (Технический
Университет), Санкт-Петербург, Россия

³ Всероссийский институт растениеводства имени
Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

A.P. Kozlova^{1,2}, V.S. Muntyan¹, E.A. Dzyubenko³,
A.M. Afonin¹, M.L. Roumiantseva¹

NEW RECOMBINANT FORM OF RHIZOPHAGE 16-3 FROM SOIL OF CAUCASUS

¹ Russian national research institute for agricultural
microbiology, Pushkin, Saint-Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State Institute of Technology, Saint-
Petersburg, Russia

³ Federal Research Center N.I. Vavilov All-Russian
Institute of Plant Genetic Resources (VIR) Ministry
of science and higher education, Saint-Petersburg,
Russia

alexandrak95@mail.ru

Рекомбинантный бактериофаг AP16-3 выделен из почв горного района Дагестана (Кавказ) с использованием типового штамма-ловушки *Sinorhizobium meliloti* L5-30. Его геном секвенирован (MiSeq, Illumina), собран до замкнутого кольца (61.0 т.п.н.), и аннотирован с использованием биоинформатических подходов (SPAdes, Flye, Racon, Medaka, Pilon, Prokka для вирусных геномов, BLASTn, BLASTp, Prosite, I-TASSER).

Геном AP16-3 представлен дцДНК и кодирует 94 ОРС. Среди продуктов этих ОРС выявлены структурные элементы вириона: капсид, хвост, базальная пластинка, терминаза, интеграза, эксцизионаза и порталный комплекс. Гомология AP16-3 и ранее выявленного и изученного умеренного фага *Sinorhizobium* 16-3 (NC_011103) (семейство *Siphoviridae*) составила 68.53% (BLASTp).

У AP-16-3 выявлен белок размером 430 а.о. (AP-16-3_26), входящий в состав порталного комплекса, через который происходит инъекция ДНК бактериофага в клетку бактерии. Установлено, что белок AP-16-3_26 гомологичен порталному белку YP_002117561 фага 16-3 на 98.99% (покрытие 91.9%, $E_{\text{value}} = 0$), а одна аминокислотная замена в AP-16-3_26 приводит к формированию дополнительного сайта модификации миристиновой кислотой. Моделирование третичной структуры этого порталного белка позволило установить, что ближайшим гомологом (идентичность 12.4%, покрытие 86.5%) с известной кристаллографической структурой является порталный белок (pdb4ZJN) бактериофага G20C (семейство *Siphoviridae*), инфицирующего термофильную бактерию *Thermus thermophilus*, модельный организм структурной биологии.

Анализ аминокислотных последовательностей AP16-3, продуктов 33 ОРС, негомологических фагу 16-3, показал, что продукты 16 ОРС сходны с таковыми Gr⁺ и Gr⁻ бактерий, а также с белковыми продуктами одноклеточных эукариот и бактериофагов порядка *Caudovirales*; 15 аминокислотных последовательностей были сходными с таковыми бактерий семейства *Rhizobiaceae*, а также грамположительных бактерий, гриба *Colletotrichum*

fructicola Nara gc5 и рыбы *Carassius auratus*, одна ОРС гомологична последовательности из *Escherichia phage* ECD7, а другая ОРС, наоборот, не имела гомологов среди известных (гипотетический белок размером 55 а. о.).

Таким образом, нами выделен почвенный бактериофаг, геном которого сходен с геномом *Sinorhizobium* 16-3 на 68.53%. Отличающаяся часть генома AP16-3 несет последовательности, гомологичные бактериям из семейства *Rhizobiaceae*, грамположительным бактериям и эукариотам, что позволяет рассматривать почвенный бактериофаг AP16-3 как природную рекомбинантную форму *Sinorhizobium phage* 16-3. Специфичные для бактериофага AP16-3 однонуклеотидные замены в порталном белке, могут быть использованы для получения фагорезистентных штаммов, применяемых при приготовлении биопрепаратов.

Работа выполнена в рамках РФФИ 18-04-01278а и РФФ 20-16-00105 (секвенирование генома фага AP16-3).

И.П. Копнин¹, Н.А. Логвина¹,
И.О. Апарин¹, Т.С. Зацепин^{1,2}

НОВЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ РНК ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS9

¹ Центр наук о жизни, Сколковский научно-технологический институт, Москва, Россия

² Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

I.P. Kopnin¹, N.A. Logvina¹,
I.O. Aparin¹, T.S. Zatsepin^{1,2}

NEW CHEMICAL MODIFICATIONS OF GUIDE RNA TO IMPROVE THE EFFICIENCY OF GENOME EDITING BY CRISPR – CAS9 SYSTEM

¹ Center of Life Science, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

² Faculty of Chemistry, MSU, Moscow, Russia

ilia.kopnin@skoltech.ru

За последние несколько лет система CRISPR-Cas9 стала популярным и довольно эффективным инструментом для геномной инженерии. Эта система используется не только в исследовательских целях, но также для разработки новых возможных методов терапии.

Возможные применения системы CRISPR-Cas9 не ограничиваются геномной инженерией в привычном понимании, но также включают в себя генетический скрининг, регуляцию экспрессии генов, посредством инициации трансляции, или же, наоборот, ингибирования, а также метилирования геномной ДНК или гистонов и инкорпорация ДНК последовательностей в целевые позиции генома.

Все ныне существующие модификации системы CRISPR-Cas9 направлены в основном на распознавание целевой последовательности ДНК РибоНуклеоПротеидным (РНП) комплексом, основанной на комплементарности относительно короткой олигонуклеотидной последовательности. Эффективность и специфичность связывания спейсерной части гидовой РНК и целевой ДНК особенно важна для терапевтического применения этой системы. Однако селективность этой

системы все еще недостаточна для повсеместного применения в терапии. Неконтролируемые инсерции и делеции, которые происходят в нецелевых участках геномной ДНК, могут приводить к онкотрансформации клеток после *ex vivo* или *in vivo* геномной инженерии.

В нашей работе мы использовали комбинацию уже известных и новых РНК модификаций с целью улучшить характеристики системы CRISPR-Cas9 для получения возможности применять ее в терапевтических целях. Новые модификации показали стабилизацию РНК *in vivo*, а также меньшую токсичность по сравнению с тиофосфатными модификациями, которые в основном используются для предотвращения деградации синтетической РНК *in vivo*. Мы исследовали паттерны модификаций, которые могут в дальнейшем улучшить терапевтическую эффективность и специфичность системы CRISPR-Cas9 без критического уменьшения эффективности геномного редактирования и сопоставили эти результаты с уже имеющимися паттернами. Так же мы проанализировали влияние новых модификаций на эффективность системы CRISPR-Cas9, в которых использовались мутантные версии белка, обладающие большей специфичностью по сравнению с диким типом белка Cas9.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 19-04-00298.

Я.А. Кучинская, Е.С. Боровых,
М.А. Некрасова, А.Ю. Конев

ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФАКТОРОВ СБОРКИ И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА В ПОДВЕРГАЮЩЕЙСЯ ДОЗОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ X-ХРОМОСОМЕ У САМЦОВ ДРОЗОФИЛЫ

НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ, Гатчина, Россия

Y.A. Kuchinskaya, E.S. Borovykh,
M.A. Nekrasova, A.Y. Konev

LOCALIZATION OF CHROMATIN ASSEMBLY AND REMODELING FACTORS IN THE DOSE-COMPENSATED MALE X-CHROMOSOME IN DROSOPHILA

NRC "Kurchatov Institute" — PNPI

kuchinskaya_yaa@pnpi.nrcki.ru

Для изучения процессов регуляции генов используется модель дозовой компенсации у самцов *Drosophila melanogaster*, включающая в себя как генетические, так и тонкие эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов. Процесс дозовой компенсации (ДК) сам по себе является предметом интереса исследователей: как благодаря фундаментальным чертам данного механизма, так и из-за происходящего при этом специфического нацеливания белковых комплексов на X-хромосому. У дрозофилы основную роль в этом процессе играет комплекс дозовой компенсации или MSL-комплекс (MSL: male-specific lethal), включающий в себя белки MSL1-MSL3, две некодирующие РНК (roX1 и roX2), ацетилтрансферазу MOF и РНК геликазу MLE [1].

В рамках данной работы нас интересует, прежде всего, консервативный хроматин-ремоделирующий фактор CHD1, участвующий в специфических преобразованиях

хроматина, связанных с активной транскрипцией. Показано, что мутации кодирующего его гена *Chd1* ведут к сильной деформации и деконденсации X-хромосомы самцов [2]. Нами показано, что в норме данный фактор активно привлекается к сайтам связывания комплекса MSL на X-хромосоме, необходимым условием этого является функционирующий комплекс ДК. У нуль-мутантных по гену *Chd1* самцов весь соответствующий белок материнского происхождения связывается исключительно с X-хромосомой [3].

На данный момент нами изучается ряд факторов: представитель того же семейства, что и CHD1 — kismet, и близкий по функциям к CHD1 белок ISWI, а также представители двух других семейств — Ino80 и brahma. Известно, что картина изменений X-хромосомы самцов у мутантов по гену *Iswi* схожа с таковой *Chd1*, но полученные результаты иммуноокрашивания политенных хромосом антителами к ISWI показали отсутствие для данного белка специфического привлечения к X-хромосоме у самцов дикого типа и дополнительных сайтов связывания. У нуль-мутантных по гену *Chd1* самцов этот фактор также не показал какого-либо специфического привлечения к половой хромосоме. Такой же эксперимент проведен для brahma, kismet и Ino80. Все они не привлекались специфически к X-хромосоме самцов дикого типа или *Chd1* мутантов, что свидетельствует о специфической и незаменимой роли фактора CHD1 в подвергающейся ДК X-хромосоме самцов дрозофилы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00864.

Литература:

1. Conrad, T. and Akhtar, A. *Nat. Rev. Genet.* 2012; 13(2): 123–134.
2. Конев А.Ю., Тютюнник, А.А., Барановская, И.Л. *Цитология.* 2016; 58(4): 281–284.
3. Tutiunnik A. et al., *Biopolymers & Cell.* 2019; 35(3): 174–175.

В.В. Лашкул^{1,2,3}, А.Е. Зобнина^{1,3}, А.Ю. Аксенова¹, Д.В. Качкин^{1,2,3}, А.А. Зелинский^{1,2}, О.А. Маликова^{1,2,3}, А.А. Рубель^{1,2,3}, Ю.О. Чернов^{1,4}

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ РИБОСОМАЛЬНЫХ БЕЛКОВ К АГРЕГАЦИИ

¹ Научная лаборатория биологии амилоидов Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-технологический университет Сириус, Сочи, Россия

⁴ School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

V.V. Lashkul^{1,2,3}, A.E. Zobnina^{1,3}, A.Y. Aksenova¹, D.V. Kachkin^{1,2,3}, A.A. Zelinsky^{1,2}, O.A. Malikova^{1,2,3}, A.A. Rubel^{1,2,3}, Y.O. Chernoff^{1,4}

ASSESSMENT OF THE AGGREGATION ABILITIES OF RIBOSOMAL PROTEINS

¹ Laboratory of Amyloid Biology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

² Department of Genetics and Biotechnology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

³ Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

⁴ School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA

lashkulvv@mail.ru

Амилоиды — белковые агрегаты фибриллярной природы, формирующие межмолекулярные кросс-β-структуры, связанные с более чем 50 заболеваниями (амилоидозами), среди которых наиболее социально значимыми являются такие как болезни Альцгеймера и Паркинсона и диабет II типа. В последние годы появляется всё больше данных о так называемых функциональных амилоидах, выполняющих важные биологические функции, такие как регуляция долговременной памяти, участие в полимеризации меланина, хранение пептидных гормонов и др.

Несмотря на то, что амилоиды активно изучаются, имеющиеся о них данные носят разрозненный характер и не позволяют в полной мере оценить распространённость и значимость амилоидов в живой природе, в том числе у человека. В рамках данного проекта, мы идентифицируем новые амилоидогенные белки и изучаем биологическую роль амилоидогенеза в жизнедеятельности организмов. Разработанная ранее дрожжевая тест-система позволяет проводить масштабный поиск амилоидных белков в протеомах различных организмов, включая и человека [1]. Для такого анализа нами была получена библиотека химерных генов, пригодная для экспрессии в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Библиотека включает последовательности кДНК человека, слитые с прионным доменом дрожжевого белка Sup35N. Прионный домен дрожжевого белка не формирует амилоид самостоятельно в отсутствие предсуществующих амилоидов. Слияние с амилоидогенным белком человека приводит к образованию фенотипически детектируемого амилоида. Первичный скрининг выявил ряд белков человека, потенциально обладающих амилоидными свойствами, включая несколько рибосомальных белков. Поскольку рибосомальные белки представляют

собой эволюционно древние белки, в норме продуцируемые в стехиометрических соотношениях и включённые в высокомолекулярные комплексы, их способность к агрегации может быть связана с биологическими регуляторными механизмами.

Представленные в работе данные посвящены дальнейшему анализу агрегационных свойств рибосомальных белков человека с использованием генетических, биохимических и цитологических методов.

Работа выполняется при поддержке грантов РФФИ № 19-34-51054 и СПбГУ ID 51140332, а также ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС», «Биобанк» и «РМИКТ» научного парка СПбГУ.

Литература:

1. Chandramowlishwaran P. et al., J. Biol. Chem. V. 2018; 293(9): 3436–3450.

В.А. Ли¹, Д.И. Жигалина²

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦИТОТРОФОБЛАСТА СПОНТАННЫХ АБОРТУСОВ С НИЗКОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ КЛЕТОК *IN VITRO*

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

² Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, Томск, Россия

V.A. Li¹, D.I. Zhigalina²

MOLECULAR CYTOGENETIC ANALYSIS OF CYTOTROPHOBLAST OF SPONTANEOUS MISCARRIAGES WITH LOW PROLIFERATIVE ACTIVITY *IN VITRO*

¹ Siberian state medical university, Tomsk, Russia

² Research Institute of Medical Genetics of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

vasilissalee@gmail.com

Низкая пролиферативная активность клеток *in vitro* в 5–42% случаев не позволяет определить кариотипы спонтанных абортусов (СА) методами стандартной цитогенетики [1]. Для характеристики хромосомной конституции в данном типе биологического материала используются молекулярно-цитогенетическая и цитогенетическая методы, в частности метод метафазной сравнительной геномной гибридизации (Conventional Comparative Genomic Hybridization — cCGH).

В настоящем исследовании методом cCGH нами были проанализированы фрагменты плодного мешка 57 СА с низкой пролиферативной активностью *in vitro*, полученных от 45 женщин.

По результатам cCGH в 50,9% (29/57) СА был отмечен несбалансированный хромосомный набор. При этом средняя частота хромосомных аномалий у СА по литературным данным составляет около 50% [2]. Нами была выявлена статистически значимая связь между частотой хромосомных aberrаций СА и наличием в анамнезе у женщин диагноза «привычное невынашивание беременности (ПНБ)» и «спорадический аборт». В группе СА от женщин с ПНБ частота абортусов с несбалансированным кариотипом составила 29,2%, а в группе

женщин со спорадическим СА — 66,7% ($p = 0,006$), что, вероятно, обусловлено значительным влиянием негенетических факторов в группе женщин с ПНБ. Вероятность того, что молекулярный кариотип первого и последующего СА у женщин с ПНБ будет сбалансированным, составила 58,3%, что несколько ниже вероятности, полученной на основе стандартного цитогенетического анализа (86,7%) [2].

Полученные данные сопоставимы с результатами стандартного цитогенетического анализа тканей СА с нормальной пролиферативной активностью *in vitro*, представленными в литературе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-74-10026

Литература:

1. Merel M.J. van den Berg, Merel C. van Maarle et al. Genetics of early miscarriage. Biochimica et Biophysica Acta. 2012; 1822: 1951–1959
2. Никитина Т.В., Лебедев И.Н. Цитогенетика привычного невынашивания беременности. Генетика. 2014; 50(5): 501–514.

С.П. Медведев

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ И ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ БИОСЕНСОРЫ: СИНТЕЗ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ЗАДАЧ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

S.P. Medvedev

INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, GENOME EDITING AND GENETICALLY ENCODED BIOSENSORS: SYNTHESIS OF TECHNOLOGIES FOR SOLVING BIOMEDICAL PROBLEMS

Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Novosibirsk, Russia

medvedev@bionet.nsc.ru

Использование плюрипотентных клеток в качестве моделей заболеваний человека является одной из наиболее динамично развивающихся направлений современной биомедицины, имеющим огромный потенциал применения в фармакологии, токсикологии, регенеративной медицине и лечении наследственных болезней. Плюрипотентные клетки, культивируемые в лабораторных условиях, активно используются для тестирования новых лекарственных соединений на ранних этапах их разработки. С появлением более эффективных и простых в использовании технологий направленного редактирования геномов, таких как CRISPR/Cas9, появились новые возможности исследования роли генов и других элементов генома в нормальных и патологических процессах. Кроме того, стало возможно создание клеточных линий, которые несут в геномах трансгены, предназначенные для исследования экспрессии генов, визуализации внутриклеточной локализации белков и их взаимодействий,

а также количественной оценки концентрации различных низкомолекулярных соединений. Использование генетически кодируемых белков-биосенсоров позволяет исследовать такие важные физиологические параметры клетки как соотношение окисленной и восстановленной формы глутатиона, концентрация перекиси водорода, динамика внутриклеточного кальция и т. д. в живых клетках, в режиме реального времени. Более того, с помощью биосенсоров можно детектировать активность регуляторных каскадов, например, системы ответа на стресс эндоплазматического ретикула.

В докладе речь пойдет о совместном использовании технологий индуцированной плюрипотентности, CRISPR-опосредованной гомологичной рекомбинации и генетически кодируемых биосенсоров для создания моделей нейродегенеративных заболеваний человека, исследовании молекулярно-генетических механизмов данных болезней и поиске новых средств терапии.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-29-04011 мк.

Е.С. Минина¹, А.К. Какойченкова^{1,2}, И.С. Минин³

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
ТРАНСКРИПТОМОВ КЛЕТОК НАЗАЛЬНОГО
ЛАВАЖА У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ
АСТМОЙ НА ФОНЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

¹ Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

² ООО «Nativita», Минск, Беларусь

³ ООО «Лаборатория цифрового зрения», Москва, Россия

E.S. Minina¹, A.K. Kakoichankava^{1,2}, I.S. Minin³

**FUNCTIONAL ANALYSIS OF NASAL LAVAGE
CELL TRANSCRIPTOMES IN PATIENTS
WITH BRONCHIAL ASTHMA ON THE VIRAL
INFECTION BACKGROUND**

¹ Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

² Nativita, Minsk, Belarus

³ Digital Vision Labs LLC, Moscow, Russia

minina.e.s@mail.ru

В нашей работе было проанализировано 56 транскриптомов клеток назального лаважа, полученных из базы данных Gene Expression Omnibus (GSE30326, GSE51392). В исследование были включены пациенты с обострением бронхиальной астмы (БА) на фоне пикорнавирусной инфекции (n=32), пациенты с БА и здоровые люди (без аллергопатологии), у которых проводилась стимуляция изолированных эпителиальных клеток препаратом полицитидиловой кислоты (n=24). Для анализа транскриптомных данных использовали программное обеспечение Transcriptome Analysis Console (TAC) Software, ThermoFisher.

Анализ транскриптомных данных пациентов с БА и здоровых людей при моделировании вирусной инфекции выявил активацию сигнального пути эндотелиального ростового фактора, интерлейкина-18, системы Toll-like рецепторов, интерферона альфа/бета, сигнального пути интерферона II (IFNG), снижение активации цитлиарного сигнального пути и клеточного цикла. Следует отметить, что значимость данных путей была более выражена у здоровых пациентов.

При обострении БА на фоне пикорнавирусной инфекции в сравнении с состоянием

после вирус-индуцированного обострения БА (через 7–14 дней) наблюдалась гиперэкспрессия ряда генов, участвующих в сигнальном пути эндотелиального ростового фактора, интерлейкина-18, Toll-like рецепторов, интерферона альфа/бета и сигнального пути интерферона II (IFNG).

Таким образом, функциональный анализ транскриптомов клеток назального лаважа у пациентов с БА на фоне пикорнавирусной инфекции и в модели «БА + вирусная инфекция» демонстрирует активацию сигнальных путей, направленных на мобилизацию системы адаптивного противовирусного иммунного ответа, связанного с повышенной продукцией интерферонов, активацией системы Toll-like рецепторов и интерлейкина-18. При этом у пациентов с БА на фоне вирусной инфекции наблюдается иммуносупрессия в сравнении со здоровыми людьми (без аллергопатологии).

Работа выполнена в рамках темы НИР № 20180308 Витебского государственного медицинского университета «Разработка новых методов диагностики, лечения и профилактики аллергических и иммунодефицитных заболеваний».

А.А. Мурашкина¹, Р.Р. Савченко², С.А. Васильев²

**ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО
ПРОФИЛЯ В ЛИНИЯХ, НОКАУТНЫХ
ПО ГЕНАМ ADAMTS1 И THBS1**

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

² НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Томск, Россия

A.A. Murashkina¹, R.R. Savchenko², S.A. Vasilyev²

**TRANSCRIPTION PROFILE CHANGES IN CELL
LINES WITH KNOCK-OUT OF ADAMTS1 AND
THBS1 GENES**

¹ National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia

anastasiya.murashkina.97@mail.ru

Выявление генов, лежащих в основе явления индивидуальной радиочувствительности, является одной из приоритетных задач в современной лучевой терапии онкологических заболеваний.

В предварительных исследованиях были выявлены гены, дифференциальная экспрессия которых оказалась связана с эффективностью репарации двуниевых разрывов ДНК. Клеточные линии HeLa с нокаутом по данным генам подвергались воздействию γ -излучения ⁶⁰Co в дозе 2 Гр, после чего был проведен анализ с помощью экспрессионных микрочипов SurePrint G3 (Agilent Technologies).

Нокаут генов ADAMTS1 и THBS1 приводил к снижению их собственной экспрессии: в 2,3 раза и в 2,1 раза соответственно. Кроме того, в линии с нокаутом ADAMTS1 экспрессия 57 генов изменялась более чем в 2 раза по сравнению с исходной линией HeLa (повышалась для 33 и снижалась для 24 генов). Условию FDR < 0,05 удовлетворяли 12 генов: 7 генов повышали экспрессию, а 5 — снижали. В линии с нокаутом THBS1 изменялась экспрессия 64 генов (повышалась для 30 и снижалась для 34 генов). Условию FDR <

0,05 удовлетворяли 3 гена: 1 — с повышенной экспрессией; 2 — с пониженной. После облучения в линии с нокаутом *ADAMTS1* экспрессия 56 генов была выше (9 генов с $FDR < 0,05$) а 47 генов — ниже по сравнению с облученной исходной линией HeLa (6 генов с $FDR < 0,05$). В линии с нокаутом *THBS1* 50 генов экспрессировались сильнее, а 44 гена — слабее, чем в облученной исходной линии HeLa. Три гена соответствовали критерию $FDR < 0,05$: 1 — с повышенной экспрессией и 2 — с пониженной экспрессией.

Результаты полнотранскриптомного анализа были подтверждены с помощью ПЦР в реальном времени: при нокауте *ADAMTS1* оказалась значимо повышена экспрессия гена *SEPP1*, селенопротеин, и значимо снижена экспрессия гена *LXN*, кодирующего ингибитор карбоксипептидаз.

Таким образом, нокаут генов *ADAMTS1* и *THBS1* приводит к значительным изменениям транскрипционного профиля опухолевых клеток как до, так и после воздействия ионизирующего излучения.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ № МК-5944.2018.4.

Настоящая работа выполнена при поддержке Программы повышения международной конкурентоспособности Томского государственного университета на 2013–2020 гг.

**А.Д. Мутин¹, К.П. Верещагина¹, Л. Якоб²,
Д.С. Бедулина¹, М. Люкассен², М.А. Тимофеев¹**
**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
МЕТАБОЛИЗМА БАЙКАЛЬСКИХ
ЭНДЕМИЧНЫХ И ГОЛАРКТИЧЕСКИХ
АМФИПОД В УСЛОВИЯХ ПОСТЕПЕННОГО
ПОВЫШЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ**

¹ Научно-исследовательский институт биологии
Иркутского государственного университета,
Иркутск, Россия

² Институт полярных и морских исследований имени
Альфреда Вегенера, Бремерхафен, Германия

**A.D. Mutin¹, K.P. Vereshchagina¹, L. Jakob²,
D.S. Bedulina¹, M. Lucassen², M.A. Timofeyev¹**
**METABOLIC GENE EXPRESSION OF LAKE
BAIKAL ENDEMIC AND HOLARCTIC
AMPHIPODS UNDER GRADUAL TEMPERATURE
INCREASE**

¹ Institute of Biology, Irkutsk State University, Irkutsk,
Russia

² Alfred Wegener Institute Helmholtz Centre for Polar
and Marine Research, Bremerhaven, Germany

andreimutin97@gmail.com

Температура является одним из наиболее важных экологических факторов, влияющих на все аспекты жизнедеятельности организмов на всех уровнях организации.

Целью данного исследования являлась оценка экспрессии ключевых генов энергетического метаболизма и оценка межвидовых различий в энергетическом метаболизме у байкальских эндемичных амфипод видов *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858) и *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb., 1874), а также голарктического *Gammarus lacustris* Sars, 1863 в условиях постепенного повышения температуры среды.

Перед экспериментом амфипод акклимировали в лабораторных условиях не менее 3 дней. Контрольную группу содержали при температуре $6 \pm 0,8$ °C на протяжении всего эксперимента. Экспериментальную группу экспонировали в условиях постепенного повышения температуры среды (0,8 °C/день) в течение 24 дней. Для дальнейших исследований животных фиксировали в жидком азоте при достижении температур 12.4, 18.8 и 23.6 °C. По результатам исследования показано значимое повышение экспрессии генов *белков теплового шока 70 (БТШ70)* у байкальского вида *E. verrucosus* при повышении температуры среды, тогда как экспрессия генов *Na⁺, K⁺-АТФазы, АТФ-синтазы (субъединица альфа)* и *фосфофруктокиназы* в данных условиях, наоборот, снижалась. Для термоустойчивого байкальского вида *E. cyaneus* наблюдали значимое повышение экспрессии генов *БТШ70*, а также *гексокиназы, оксоглутаратдегидрогеназы, актина, АТФ-синтазы (субъединица гамма)*, тогда как экспрессия генов *Na⁺, K⁺-АТФазы* и *АТФ-синтазы (субъединица альфа)* значимо снижалась. У голарктического вида-убиквиста *G. lacustris* происходило значимое повышение экспрессии генов *АТФ-синтазы (субъединица гамма)* и *БТШ70*, в то время как экспрессия *гексокиназы* значимо снижалась.

Согласно результатам корреляционного анализа значений экспрессии исследованных генов у вида *E. verrucosus* показана сильная положительная корреляция между *глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназой* и *цитратсинтазой*. У теплолюбивого байкальского *E. cyaneus* отмечена сильная положительная корреляция между значениями экспрессии генов *актина* и *БТШ70*. Для вида-убиквиста *G. lacustris* была показана сильная положительная корреляционная связь между значениями экспрессии генов *глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы* и *пируваткиназы*.

Таким образом показано, что для всех исследованных видов амфипод характерны различные стратегии энергообеспечения во время постепенного повышения температуры среды. Посредством корреляционного анализа показаны межвидовые различия на уровне коэкспрессии исследованных генов. Полученные данные указывают на более выраженные изменения экспрессии генов при постепенном повышении температуры у двух байкальских видов амфипод в сравнении с голарктическим.

Исследование проведено при финансовой поддержке гранта РФФ-объединение им. Гельмогльца (Германия) № 18-44-06201.

М.А. Орлов, Т.Р. Дзелядин, А.А. Сорокин
**ПРОМОТОР Т7 БАКТЕРИОФАГА: СВЯЗЬ
СПЕЦИФИЧНОСТИ И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
ОПОСРЕДОВАНА ФИЗИКОЙ ДУПЛЕКСА ДНК?**

ИБК РАН ФИЦ «Пуцинский научный центр
биологических исследований Российской академии
наук», Пуццино, Россия

M.A. Orlov, T.R. Dzhelyadin, A.A. Sorokin
**T7 BACTERIOPHAGE PROMOTER: IS RELATION
BETWEEN SPECIFICITY AND SEQUENCE
MEDIATED BY DNA DUPLEX PHYSICS?**

Institute of Cell Biophysics of RAS, Pushchino, Russia

orlovmikhaianat@gmail.com

Узнавание промотора РНК-полимеразой в процессе транскрипции является фундаментальной проблемой молекулярной генетики. Несмотря на длительный интерес исследователей, эта область продолжает развиваться. Большие успехи могут обеспечить методы NGS и мутационный анализ. Недавно подобная работа [1] проведена с целью изучения активности промотора бактериофага T7. Авторы получили 7847 вариантов консенсусного промотора. Такие варианты имели от 1 до 10 замен; для них была оценена активность (как соотношение уровней транскрипта РНК и ДНК). Полученные данные подтвердили многие представления о значении отдельных положений промоторной последовательности и ее областей. В данной работе мы провели дальнейший анализ данных [1], выявив согласованность в изменениях отдельных пар оснований промоторных последовательностей и функциональных областей промотора T7. В частности, выявлена высокая согласованность мутаций (их совместное присутствие в отдельном промоторном варианте) для петли специфичности (specificity loop of binding region). Область инициации транскрипции (в которой происходит открытие дуплекса) характеризуется наименьшим количеством замен, которые при этом редко сочетаются между собой.

В ходе работы отмечена группа промоторных вариантов, имеющих точную консенсусную последовательность и случайный нуклеотид в положении -2. Все 4 таких варианта получены в [1] и высокоактивны. При расчете для таких последовательностей профилей электростатического потенциала и склонностью к изгибам установлены очень существенные изменения при замене в названной позиции. В случае электростатического потенциала замены Т на А достаточно, чтобы характерный для промоторов класса II паттерн профилей перешёл в таковой для класса III [2].

Литература:

1. Komura R., Aoki W., Motone K., et al. PLOS ONE. 2018; 5(13): e0196905.
2. Orlov, M. A., & Sorokin, A.A. Journal of Bioinformatics and Computational Biology. 2020. <https://doi.org/10.1142/s0219720020400016>

А.И. Пасынков¹, Е.В. Голубкова¹,
Л.А. Мамон¹, А.О. Якимова²

СОХРАНЕНИЕ ИНТРОНОВ В ХОДЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА КАК МЕХАНИЗМ УВЕЛИЧЕНИЯ РАЗНООБРАЗИЯ ПРОДУКТОВ МАТРИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ НА ПРИМЕРЕ ГЕНА *NXF1*

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

² Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава РФ, Обнинск, Россия

A. Pasyнков¹, E. Golubkova¹,
L. Mamon¹, A. Yakimova²

NXF1 GENE AS AN EXAMPLE OF GENE EXPRESSION PRODUCTS DIVERSIFICATION VIA INTRON PRESERVATION IN THE COURSE OF ALTERNATIVE SPLICING

¹ Saint Petersburg State University, Department of genetics and biotechnology, Saint Petersburg, Russia

² A. Tsyb Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

alloc42@gmail.com

Долгое время считалось, что интроны не несут в себе значимой генетической информации, и, хотя это предположение было опровергнуто достаточное время назад, до сегодняшнего дня мы продолжаем открывать новые свойства интронов как участников процессов реализации генетической информации.

Так, согласно нашим данным, интрон в гене *Nxf1* может играть существенную роль в функционировании этого гена. *Nxf1* — это эволюционно-консервативный ген, обнаруживающийся у всех представителей группы *Opisthokonta*. Основной продукт этого гена — белок NXF1 — осуществляет ядерный транспорт мРНК и имеет соответствующую доменную структуру. У данного белка выделяют РНК-связывающий домен, домен лейцин-богатых повторов, домен связывания белка NXT1 — белка-партнера NXF1, а также домен связывания с ядерным поровым комплексом.

Однако NXF1 является не единственным белковым продуктом гена *Nxf1*. Ранее мы показали, что для дрозофилы характерно наличие как минимум четырех альтернативных транскриптов, каждому из которых соответствует собственный белок. Один из этих транскриптов сохраняет в себе интрон 5–6, содержащий стоп-кодон. Его трансляция приводит к появлению укороченного варианта белка NXF1. Стоит отметить, что наличие такой формы белка было показано не только для дрозофилы, но и для млекопитающих. Отсутствие домена связывания с ядерным поровым комплексом, хотя и делает невозможным участие этой формы белка в процессах ядерного экспорта, не означает потерю функциональности белка. Напротив, полученные нами данные позволяют предположить, что данная изоформа не только является функциональной, но и выполняет важную роль в развитии многоклеточных организмов.

Развитие нервной системы — в частности, нацеливание и рост отростков нейронов, находится в жесткой зависимости от локализации мРНК в клетке и времени

ее трансляции. Ранее нам удалось показать повышенный уровень содержания сохраняющего интрон транскрипта в нервной системе дрозифилы, а также особенности локализации соответствующего ему белка. Укороченный NXF1, в отличие от полноразмерной формы белка, располагается не только в ядре и ядерной оболочке, но и в цитоплазме нервных клеток. Более того, его локализация часто совпадает с локализацией актиновых филаментов в областях активных цитоскелетных перестроек. Принимая во внимание фенотипические проявления мутаций в данном гене у дрозифилы — включающие в себя такие аномалии как нарушения морфологии мозга и нарушения поведения, а также доменную структуру укороченного белка, можно предположить его роль в нейрогенезе. Мы считаем, что благодаря наличию РНК-связывающей активности укороченная форма NXF1 участвует в связывании, локализации, и сохранении мРНК в составе рибонуклеопротеиновых комплексов в клетках нервной системы, принимая, таким образом, непосредственное участие в ее морфогенезе.

Грант РФФИ 19-04-01255 а: «Изучение влияния РНК-связывающего белка NXF1 на формирование и функционирование нервной системы».

А.Л. Подлевских, И.Е. Борисенко

ОРГАНИЗАЦИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ TGF-BETA И ЕГО АКТИВНОСТЬ В РАЗВИТИИ ГУБКИ HALISARCA DUJARDINI

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

A.L. Podlevskikh, I.E. Borisenko

ORGANIZATION OF THE TGF-BETA SIGNALING PATHWAY AND ITS ACTIVITY IN THE DEMOSPONGE HALISARCA DUJARDINI DEVELOPMENT

Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

ann-vesta201395@yandex.ru

Сигнальный путь TGF- β — один из основных путей межклеточной коммуникации, принимающий участие в развитии многоклеточных животных. Компоненты этого сигнального пути присутствуют у всех Metazoa. Суперсемейство лигандов TGF- β включает в себя несколько семейств (TGF- β sensu stricto, BMP, GDF и т. д.), участвующих в различных процессах эмбрионального и постэмбрионального развития, таких как пролиферация, миграция, дифференцировка клеток, апоптоз. Одним из важнейших процессов в эмбриональном развитии животных, которые регулируются каскадом TGF- β , является становление полярности зародышей. Так как изменение осевой организации, такое как появление дорсо-вентральной оси и, соответственно, появление билатерально-симметричных организмов, является одним из важнейших событий эволюции животных, изучение механизмов, с помощью которых реализуется формирование осей тела, представляется интересным и необходимым для создания полной картины эволюционного процесса. Такие исследования особенно актуальны для базальных клад многоклеточных, поскольку с их помощью можно сделать предположение о механизмах создания новой в истории животных оси тела. Одной из таких групп является тип Porifera (Губки). Объектом

нашего исследования стала губка *Halisarca dujardini* (класс Demospongiae).

Ранее нами были определены последовательно ортологов генов, кодирующих лиганды (8 молекул), рецепторы (6 молекул) и Smad-белки (6 молекул), участвующие в TGF- β -сигналинге, синтезированы зонды для гибридизации *in situ*. На данный момент проведен филогенетический анализ лигандов, из восьми лигандов пять сформировали хорошо поддержанную группу в основании филогенетического дерева, а три были отнесены к TGF- β sensu stricto. Материал для исследования был собран в Белом море с помощью кошкования. Были определены стадии развития, на которых находятся зародыши (ооциты, разные стадии дробления, личинки). Проведена гибридизация *in situ* с ортологами лигандов, которая показывает наличие их экспрессии на разных стадиях развития губки: некоторые из них экспрессируются диффузно во всем зародыше, некоторые (на стадии формирования предличинки) демонстрируют более интенсивную экспрессию в наружном клеточном слое, некоторые также экспрессируются в клетках эмбриональной капсулы. Один из лигандов не показал экспрессии в зародышах. Будут проведены эксперименты по выявлению паттерна экспрессии рецепторов TGF- β и локализации активных форм Smad-белков при помощи непрямой иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии.

Проект выполняется при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00398, с использованием оборудования РЦ РМиКТ СПбГУ.

М.С. Попик¹, А.И. Соловьева^{2,3}, О.И. Подгорная^{2,4}

КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РЕТРОТРАНСПОЗОНА PAO ИЗ ГЕНОМА ТРЕМАТОДЫ HIMASTHLA ELONGATA

¹ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

² Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

M.S. Popik¹, A.I. Solovyeva^{2,3}, O.I. Podgornaya^{2,4}

CLONING AND ANALYSIS OF THE PAO RETROTRANSPOSON NUCLEOTIDE SEQUENCE FROM THE TREMATODE HIMASTHLA ELONGATA GENOME

¹ Saint-Petersburg State Institute of Technology, Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

³ Zoological Institute RAS, Saint-Petersburg, Russia

⁴ Saint Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

masha.pm97@gmail.com

Одной из фундаментальных биологических проблем является выявление механизмов формирования и сохранения разнообразия многоклеточных животных, размножение которых не сопровождается половым процессом. В связи с этим большой интерес представляют уникальные жизненные циклы трематод, которые проходят

с чередованием партеногенетических и гермафродитных поколений.

Долгое время считалось, что, как и у других трематод, все партеногенетические личинки (партениты) *Himasthla elongata*, произошедшие от одного мирацидия, должны нести одинаковый генотип, то есть, являться клонами. Ранее с помощью метода AFLP (Amplified fragments length polymorphism) выявили внутриклональный полиморфизм партенит *H.elongata*. Причины появления этой изменчивости до конца не установлены, однако существует гипотеза об участии мобильных элементов генома в возникновении этого феномена. В результате клонирования и секвенирования фрагментов AFLP выявили последовательности мобильных элементов разных групп, причем большая часть представлена ретро-транспозонами. LTR-ретротранспозон Рао обнаружен в полиморфных фрагментах профилей генотипирования отдельных церкарий, поэтому целью настоящей работы стало изучение природы этого ретроэлемента. Элементы Рао также обнаружены в транскриптом. Их экспрессия подтверждена ПЦР на матрице кДНК церкарий, что может свидетельствовать о наличии активных копий. Продукты ПЦР клонированы, с помощью сервисов NCBI (Blast, Conserved domain search), а также RepeatMasker проанализированы полученные нуклеотидные последовательности. В одном клонированном фрагменте обнаружена открытая рамка считывания пептидазы ретро-транспозона Рао, которая является членом суперсемейства белков rfam05380. Белки этого суперсемейства гомологичны аспарагиновым протеиназам, кодируемым ретро-транспозонами и ретровирусами.

Работа выполнена в рамках грантов РФФИ № 17-04-02161, РНФ № 19-74-20102.

Я.А. Портная¹, Ю.П. Джиоев¹, Л.А. Степаненко¹, А.Ю. Борисенко¹, О.Г. Карноухова¹, В.И. Злобин¹

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ CRISPR / CAS-СИСТЕМЫ PSEUDOMONAS AERUGINOSA NCTC10728

¹ Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия

I.A. Portnaia¹, Yu.P. Dzhioev¹, L.A. Stepanenko¹, A.Yu. Borisenko¹, O.G. Karnouhova¹, V.I. Zlobin¹

BIOINFORMATICS ANALYSIS OF STRUCTURES CRISPR/CAS-SYSTEM OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA STRAIN NCTC10728

¹ Irkutsk state medical university, Irkutsk, Russia

portnaya.yana.1997@yandex.ru

За последние десятилетия оппортунистическая бактерия *Pseudomonas aeruginosa* стала важным патогеном для человека из-за наличия факторов патогенности и устойчивости ко многим антибиотикам. Сегодня методы геномики и биоинформатики позволяют использовать современные подходы в лечении многих госпитальных заболеваний. Одним из более вероятных подходов является использование таргетных бактериофагов, отобранных через структуры CRISPR/Cas-систем бактерий. Их изучение необходимо для разработки штаммоспецифичных таргетных фагов.

Цель: дать анализ особенностей структуры CRISPR/Cas-системы штамма *P. aeruginosa* NCTC10728, детектируемых фагов и плазмид через выявленные спейсеры

в CRISPR-кассетах с целью подбора высокоспецифичных бактериофагов.

Материалы и методы. Объект исследования - геном штамма *P. aeruginosa* strain NCTC10728 из базы данных GenBank (№ NZ_LR134342.1). Для поиска структуры CRISPR/Cas-системы использованы: CRISPRCasFinder, Geneious Prime. Поиск характеристик Cas-генов осуществляли посредством программных пакетов makeblastdb (ver.2.2.28) и HMMER (ver.3.0). Для поиска CRISPR-кассет использовали софты «CRISPI: a CRISPRInteractive data base». С помощью CRISPRTarget проведена детекция фагов через спейсеры.

Результаты и обсуждение. В исследуемом геноме штамма *P. aeruginosa* NCTC10728 были выявлены два локуса CRISPR/Cas-систем. Рядом с 1-ым располагалась группа Cas-генов (тип-I, подтип-I-E). Его CRISPR-кассета имеет размер 639 н.о. и состоит из 10 спейсеров, размеры 29 н.о., а 2-ая кассета - 580 н.о., содержит 9 спейсеров, такими же размерами. Скрининг фагов через выявленные спейсеры CRISPR-кассеты-1 показал, что они специфичны ряду бактерий: *P. aeruginosa* VIT PC9, *P. aeruginosa* ST773. Для 2-ой CRISPR-кассеты выявлены фаги: *P. aeruginosa* 1811-18R001, *P. aeruginosa* 1811-13R031. Данные свидетельствуют о том, что исследуемый штамм *P. aeruginosa* обладает большой устойчивостью к ряду фагов, что дает ему стабильность при условии частой изменчивости средовых факторов.

Таким образом, используемый подход поиска и анализа структур CRISPR/Cas-систем в геномах бактерий дает возможность получать информацию о предполагаемой устойчивости конкретного штамма к обнаруженным фагам. Это позволит разработать технологию персонализированной фаготерапии и фагопрофилактики.

С.С. Ряховский, А.С. Комиссаров

ПОИСК И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ТААР ГЕНОВ В СОБРАННЫХ ГЕНОМАХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Лаборатория прикладной геномики, SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

S.S. Ryakhovsky, A.S. Komissarov

SEARCHING AND VISUALISATION OF TAAR GENES IN ASSEMBLED GENOMES OF VERTEBRATES

Laboratory of Applied Genomics, SCAMT, ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

ryakhovsky@scamt-itmo.ru

Обоняние является основной нейросенсорной функцией, с помощью которой многие виды изучают химический состав своих природных сред, для поиска пищи, избегания потенциально опасных ситуаций, определения территории, идентификации членов собственной группы и вида, хищников и поиска пары. В организмах позвоночных в ходе эволюции закрепились особенные трейс-аминовые рецепторы ТААР. Они относятся к одному из семейств белково-связывающих рецепторов, распознающие следовые амины, которые весьма схожи с дофамином, гистамином и серотонином. Особенно большая концентрация ТААР наблюдается в нейронах головного мозга в зоне, ответственной за обоняние, что образует систему обонятельных ТААР рецепторов. Помимо обонятельной функции, рецепторы следовых аминов по-разному вовлечены в регуляцию психоэмоционального состояния [1]. Было доказано, что ген ТААР6 способен

распознавать такие лиганды, как путресцин и кадаверин, образующиеся декарбоксилированием аминокислот при разложении белка. На рецепторы ТААР6 летучие полиамины действуют либо как раздражитель, либо как аттрактант для падальщиков и разного рода паразитов [2].

Целью работы является поиск и аннотация ТААР генов в трех группах животных: травоядные, хищники и падальщики.

Для этого нами создан пайплайн, основанный на аннотации ТААР генов в собранном геноме с использованием программы Exonerate. Для начального поиска мы использовали кодирующую последовательность ТААР гены мыши. Поиск был проведен в сборках геномов следующих видов: евразийский волк (*Canis lupus*), горилла (*Gorilla gorilla*), длиннохвостый суслик (*Spermophilus undulatus*), африканский слон (*Loxodonta africana*), тасманский дьявол (*Sarcophilus harrisi*).

Так как ТААР гены содержат повторяющиеся домены, то нефильтрованные данные содержали более 2000 совпадений, в результате фильтрации по score и длине совпадающей последовательности количество было сокращено до 6–9 в зависимости от вида. Из-за повторяющейся природы ТААР генов вопрос об их истинной копийности и наличия схлопнутых в результате сборки генов остается открытым. В настоящий момент мы разрабатываем подход к целевой сборке ТААР генов из несобранных ридов на основании индекса, построенного с использованием идеальной функции хеширования.

Литература:

1. Duan J., Martinez M., Sanders A.R. et al. American Journal of Human Genetics. 2004; 75(4): 624–638.
2. Izquierdo C., Gómez-Tamayo J.C., Nebel J.C. et al. PLoS Comput Biol. 2018; 14(1): e1005945.

**А.С. Саксаганская, В.С. Мунтян,
Б.В. Симаров, М.Л. Румянцев**

КРИПТИЧЕСКИЕ ПЛАЗМИДЫ SINORHIZOBIIUM MELILOTI — ПРИРОДНЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ РЕПЛИКОНЫ

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

**A.S. Saksaganskaya, V.S. Muntyan,
B.V. Simarov, M.L. Roumiantseva**

CRYPTIC PLASMIDS OF SINORHIZOBIIUM MELILOTI ARE NATURAL RECOMBINANT REPLICONS

ARRIAM, Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

allasaksaganskaya@mail.ru

Несимбиотические плазмиды клубеньковых бактерий, размер (30–600 т.п.н.) и количество (0–5) которых значительно варьирует у природных штаммов, крайне недостаточно изучены как в плане их структурной организации, так и функциональной роли в жизнедеятельности бактерий. В данной работе проведен анализ систем репликации плазмиды SMe высокоэффективного штамма *Sinorhizobium meliloti* AK555, выделенного в Приаралье, в сравнении с аналогичными репликационными референс штаммов. Известно, что *S. meliloti* содержат системы репликации RepABC типа, характерные для альфапротеобактерий. Продуктом *repA* является АТФаза

ParA-семейства, *repB* — белок ParB, а белок RepC — инициатор репликации.

Последовательность SMe получена нами с использованием методов высокопроизводительного секвенирования MinION (Oxford Nanopore Technologies) и MiSeq (Illumina); собрана и проаннотирована с помощью биоинформатических подходов (Flye, Racon, Medaka, Pilon, Prokka).

Размер плазмиды составил 453.7 т.п.н. и включал 519 открытых рамок считывания. На плазмиде выявлено 2 *repABC* оперона, а также одиночный ген *repC3*, расположенные в одном направлении. Длина оперона *repA1B1C1* составила 3624 п.н., а на расстоянии 9781 п.н. от него расположен второй оперон *repA2B2C2* размером 3721 п.н. Ген *repC3* (1278 п.н.) находится на расстоянии 3107 п.н. от оперона *repA2B2C2*. Размеры указанных оперонов и гена *repC* сопоставимы с размерами таковых, расположенных на криптических плаزمидных референс штаммов *S. meliloti*.

Сравнительный анализ продуктов генов *repC1*, *repC1* и *repC3* показал, что уровень гомологии RepC1 и RepC2 составляет 64.9%, а между RepC1 и RepC3 не превысил 28.8%. Филогенетический анализ показал, что белок RepC1 AK555 гомологичен (в среднем 94.7%) аналогичным продуктам плазмид pRmeGR4b, pSmeRU11 и pSmeSM11a штаммов *S. meliloti* GR4, RU11/001 и SM11, соответственно, а с pSINME01 штамма AK83, выделенного в том же районе Приаралья, составил 92.3%.

Продукт RepC2 гомологичен аналогичным продуктам плазмидных штаммов Rm41 и M270 на 87.6% и 86.6%, соответственно. Белок RepC3 гомологичен аналогичным последовательностям плазмид pSmeAK21b штамма AK21 (89.9%), accessoryA — HM006 (90%), accessoryA — KH35c (88.9%) и pRmeGR4a — GR4 (88.9%).

Гомология компонентов систем репликации плазмиды SMe *S. meliloti* AK555 с аналогичными системами генетически неродственных штаммов, а также тот факт, что на этой плазмиде присутствуют две копии системы репликации плазмиды, и негомологичная им система репликации, представленная *repC*, свидетельствуют о том, что плазмиды SMe были сформированы при участии не менее трех различных репликационных, и о том, что плазмиды малого размера активно участвуют в процессе горизонтального переноса генов в природных популяциях клубеньковых бактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ 18-04-01278а (анализ систем репликации) и РФФИ 20-16-00105.

А.Е. Саранчина¹, П.Б. Дроздова^{1,2},
М.М. Моргунова¹, Б.К. Бадуев¹, М.А. Тимофеев^{1,2}

**ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОКРАСКУ
ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА АМФИПОД ОЗЕРА
БАЙКАЛ *EULIMNOGAMMARUS CYANEUS***

¹ НИИ биологии ИГУ, Иркутск, Россия

² АНО «Байкальский исследовательский центр»,
Иркутск, Россия

A.E. Saranchina¹, P.B. Drozdova^{1,2},
M.M. Morgunova¹, B.K. Baduev¹, M.A. Timofeyev^{1,2}

**FACTORS INFLUENCING THE COLOR
OF A BAIKAL ENDEMIC AMPHIPOD SPECIES
*EULIMNOGAMMARUS CYANEUS***

¹ Institute of Biology, Irkutsk State University, Irkutsk,
Russia

² Baikal Research Centre, Irkutsk, Russia

alexandra147801@gmail.com

Eulimnogammarus cyaneus (Dybowski, 1874) — один из самых распространенных видов амфипод литорали озера Байкал. Данный вид интересен большим разнообразием окраски. Окраска его тела может варьировать от голубого до оранжевого. Цвет и интенсивность окраса у большинства ракообразных, в том числе у амфипод, определяется каротиноидами, которые животные получают из пищи. В организме они могут либо находиться в свободном виде, либо быть связанными с белками карустицианинами, причем в комплексе с белками цвет каротиноидов изменяется.

Данное исследование направлено на выявление фактора, в большей степени определяющего окраску: уровня каротиноидов или карустицианинов.

Отлов производили в поселке Листвянка (Южный Байкал). Животные были поделены на две равные группы: в течение двух месяцев одну группу кормили байкальской кормовой смесью (измельченная высушенная смесь амфипод и макрофитов из озера Байкал), а вторую — коммерческим кормом Tetra Crusta. Образцы гомогенизировали в ацетоне, после чего каротиноиды экстрагировали петролейным эфиром. Содержание каротиноидов определяли спектрофотометрически. Оказалось, что у голубых и у оранжевых амфипод количество каротиноидов не различалось, из чего можно сделать вывод, что их количество не определяет окрас.

Карустицианин идентифицировали методом двумерно-электрофореза в полиакриламидном геле. Для анализа использовали гемолимфу животных голубого и оранжевого окраса. В литературе нет информации о молекулярном весе и изоэлектрической точке карустицианинов амфипод, поэтому мы использовали известные последовательности карустицианинов омара *Homarus gammarus* для поиска в транскриптом *E. cyaneus*. Затем на основе этих данных мы предсказали белковые последовательности. Согласно полученным данным, карустицианины *E. cyaneus* имеют кислые изоэлектрические точки и молекулярный вес 19–29 кДа. На наших гелях этим параметрам соответствовали два пятна, расположенные в кислой части диапазона рН и ниже 50 кДа. Данные пятна у оранжевых амфипод оказались менее интенсивными, чем у голубых.

Результаты исследования показали, что количественное содержание каротиноидов не влияет на окраску рачка, в то время как содержание каротиноид-связывающего белка карустицианина напрямую влияет на формирование цвета тела *E. cyaneus*.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ № 19-74-00045.

Е.С. Сердюкова¹, О.Ю. Васильева²,
А.В. Марков², С.А. Васильев²

**МЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ
В ЦИТОТРОФОБЛАСТЕ У СПОНТАННЫХ
АБОРТУСОВ: ВЗАИМОСВЯЗЬ
С АНЕУПЛОИДИЕЙ**

¹ Национальный исследовательский Томский
государственный университет, Томск, Россия

² НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ,
Томск, Россия

E.S. Serdyukova¹, O.Yu. Vasilyeva²,
A.V. Markov², S.A. Vasilyev²

**METHYLATION OF GENE PROMOTERS
IN CYTOTROFOBLAST IN MISCARRIAGES:
CORRELATION WITH ANEUPLOIDY**

¹ National Research Tomsk State University, Tomsk,
Russia

² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk
National Research Medical Center, Tomsk, Russia

katya.serdyukova.1997@mail.ru

Внутриутробная гибель эмбриона у человека чаще всего диагностируется в первом триместре беременности. Причиной смерти эмбриона часто становятся трисомии аутосом. Несбалансированность дозы генов, произошедшая в результате изменения числа хромосом при анеуплоидии, может стать причиной изменения степени метилирования ДНК в промоторах некоторых генов, что в результате отразится на внутриутробном развитии плода. По нашим предварительным данным в выборке спонтанных абортусов с анеуплоидией наблюдается повышенный уровень метилирования в промоторах ряда генов. В настоящем исследовании был проведен более детальный анализ уровня метилирования в промоторах некоторых из этих генов — (*ANKRD53*, *GATA3*, *CALCB*, *TRPV6*, *SCL13A4*).

Цель исследования — изучить взаимосвязь уровня метилирования CpG-сайтов промоторов генов (*ANKRD53*, *GATA3*, *CALCB*, *TRPV6*, *SCL13A4*) с наличием хромосомных нарушений у спонтанных абортусов I триместра беременности.

Исследование проведено на основе биобанка НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Для проведения молекулярно-генетического анализа из трофобласта хориона 22 абортусов с трисомным кариотипом и 10 медицинских абортусов, в качестве контрольной группы; выделялась ДНК, которая затем подвергалась бисульфитной модификации. С помощью ПЦП наработаны фрагменты модифицированной ДНК с несколькими CpG-сайтами. С помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования проанализирован индекс метилирования ДНК.

Обнаружено гиперметилирование промоторов всех указанных генов у спонтанных абортусов с трисомией 16. В частности, статистически значимые различия между группами наблюдались для гена *ANKRD53*, ответственного за расхождение хромосом в митозе, что может вносить вклад в природу мозаицизма, и транскрипционного фактора *GATA3*, отвечающего за дифференцировку клеток эмбриона.

Данные результаты указывают на то, что трисомия 16 связана с эпигенетическими изменениями в геноме, сопровождающимися гибелью эмбриона на начальных этапах онтогенеза.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ № 19-74-10026.

С.С. Скрипкин, М.Д. Бочкарева, И.Р. Иматдинов
**РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН
 МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ
 ВИРУСА МАРБУРГ**

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия

S.S. Skripkin, M.D. Bochkareva, I.R. Imatdinov
**RATIONAL DESIGN OF MODIFIED
 GLYCOPROTEINS OF MARBURG VIRUS**

State Research Center of Virology and Biotechnology
 VECTOR, Russia

skripkin_ss@vector.nsc.ru

Вирус Марбург (*Marburg Marburgvirus*) является одним из самых опасных патогенов известных человечеству. Высокий уровень смертности, отсутствие лицензированных вакцинных препаратов, а также специфической терапии, налагает высокие требования к системе общественного здравоохранения. Классические подходы получения профилактических препаратов (инактивация, аттенуация и т. д.) не позволили создать эффективные вакцины против филовиральных лихорадок. С использованием генно-инженерных методов в настоящее время разрабатываются кандидатные рекомбинантные и ДНК-вакцины. Использование существующих подходов осложнено проблемами, связанными с остаточной вирулентностью векторов, выбором оптимального целевого иммуногена и поствакцинальными осложнениями.

В связи с этим комплексный подход разработки безопасной рекомбинантной вакцины против лихорадки Марбург должен быть направлен не только на модернизацию вирусных векторов, но и на совершенствование иммуногенов. Рациональный дизайн модифицированных филовиральных гликопротеинов позволит создать новые иммуногены, выступающие в качестве скаффолд-платформ для таргетной презентации пептидов (эпитопов), индуцирующих синтез вируснейтрализующих антител.

В качестве прототипа использовали оптимизированную нуклеотидную последовательность синтетического гена GP вируса лихорадки Марбург. В результате проведенного биоинформатического анализа были локализованы функциональные элементы вирусного гликопротеина, муцин-подобный домен (MLD), определены фланкирующие линкерные области, а также сайты протеолитического расщепления клеточными протеазами. Проведен дизайн экспрессирующих генетических конструкций, кодирующих модифицированные гликопротеины. Сборка генетических конструкций проведена бесшовным методом по Гибсону.

В дальнейшем первичные функциональные и иммунобиологические свойства модифицированных вариантов гликопротеинов будут изучены с использованием псевдотипированного репликационно-дефектного вируса rVSV-ΔG_mNG, экспрессирующего флуоресцентный белок mNeonGreen и не несущий на поверхности вирионов белки слияния. Пассажи псевдотипированных вирусов на интактных культурах клеток позволит оценить изменение функциональных свойств, а в реакции вируснейтрализации против антител к вирусу Марбург изучить специфические антигенные свойства.

Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00071).

Е.И. Сысоев^{1,2}, А.А. Шенфельд^{1,2},
 Ю.В. Сопова^{1,2}, А.П. Галкин^{1,2}

**АНАЛИЗ АМИЛОИДНЫХ СВОЙСТВ
 ФРАГМЕНТОВ БЕЛКА MBP
 В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ C-DAG**

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

² Санкт-Петербургский филиал ИОГен РАН, Санкт-Петербург, Россия

E.I. Sysoev^{1,2}, A.A. Shenfeld^{1,2},
 J.V. Sopova^{1,2}, A.P. Galkin^{1,2}

**ANALYSIS OF AMYLOID PROPERTIES OF MBP
 PROTEIN FRAGMENTS IN THE C-DAG
 BACTERIAL SYSTEM**

¹ Saint Petersburg State University, St Petersburg,
 Russia

² Vavilov Institute of General Genetics, St Petersburg
 Branch, St Petersburg, Russia

evgeniy_sysoev1@mail.ru

Долгое время считалось, что агрегация белков в амилоидные фибриллы и их накопление приводят исключительно к патологическим эффектам. Однако недавно была обнаружена группа т.н. функциональных амилоидов — белков, которые в амилоидной конформации регулируют жизненно-важные процессы. С помощью ранее разработанного в нашей лаборатории протеомного метода был проведен поиск функциональных амилоидов в мозге крысы *R. norvegicus*. Данный подход основан на универсальном свойстве всех амилоидов — устойчивости к ионным детергентам, таким как SDS. В результате данного протеомного скрининга в исследуемых образцах был выявлен ряд белков-кандидатов на роль функциональных амилоидов. К ним относится белок MBP (Myelin Basic Protein), который является основным компонентом миелиновой оболочки нервных волокон центральной нервной системы, способствующий адгезии и стабилизации мембран, образующих миелин. Ранее мы уже показали амилоидные свойства данного белка с помощью гистологических и биохимических методов. Также путем биоинформатического анализа был предсказан потенциально амилоидогенный регион белка MBP, включающий последовательность с 60 по 109 аминокислоту. Для подтверждения амилоидогенности выявленной последовательности была использована бактериальная система C-DAG. Данная тест система основана на продукции и экскреции во внеклеточное пространство бактериями *E.coli* интересующего белка, слитого с N-терминальным сигнальным пептидом (CsgA). Если продуцируемый химерный белок образует амилоиды, то колонии должны окрашиваться амилоид-связывающим красителем Congo Red (CR), содержащимся в питательной среде. В нашей работе для анализа был взят потенциально амилоидогенный фрагмент белка MBP(60-154), а также MBP(1-59), не содержащий амилоидогенного региона. Мы установили, что бактерии, продуцирующие белок MBP(60-154), связывают краситель CR. Более того, электронная микроскопия подтвердила наличие амилоидоподобных фибрилл в анализируемом образце. В свою очередь бактерии, продуцирующие белок MBP(1-59), не связывали краситель и в их составе не были обнаружены фибриллы. Таким образом, фрагмент белка MBP, который на основании биоинформатического анализа потенциально амилоидогенен, демонстрирует амилоидные свойства в системе C-DAG.

Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ ID 51140332, а также ресурсных центров «ЦКП ХРОМАС», «Биобанк» и «РМИКТ» научного парка СПбГУ.

С.А. Тимофеев¹, Г.В. Митина¹,
Е.А. Рогожин^{2,3}, В.В. Долгих¹

ЭКСПРЕССИЯ ТОКСИНА ПАУКА *AGELENA ORIENTALIS* В ЭНТОМОПАТОГЕННОМ ГРИБЕ *LECANICILLIUM MUSCARIUM* И ОТБОР ШТАММА, ХАРАКТЕРИЗУЮЩЕГОСЯ ЭФФЕКТИВНОЙ СЕКРЕЦИЕЙ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА

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

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

³ ФГБНУ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

S.A. Timofeev¹, G.V. Mitina¹,
E.A. Rogozhin^{2,3}, V.V. Dolgikh¹

EXPRESSION OF SPIDER *AGELENA ORIENTALIS* TOXIN IN ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *LECANICILLIUM MUSCARIUM* AND SELECTION OF THE STRAIN SHOWING EFFICIENT SECRETION OF THE RECOMBINANT PROTEIN

¹ Russian national Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

² Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

ts-bio@ya.ru

Энтомопатогенные грибы рода *Lecanicillium* длительное время являются объектом изучения в области защиты растений и широко используются для контроля численности различных насекомых-вредителей [1]. Одним из перспективных способов увеличения эффективности биопрепаратов на основе энтомопатогенных грибов является их генно-инженерная модификация, в том числе встраивание в геном чужеродных последовательностей, кодирующих белки, оказывающих непосредственное воздействие на организм насекомого-хозяина [2]. В рамках данной работы осуществлена экспрессия бета/дельта-агатоксина-1 паука *Agelena orientalis* в энтомопатогенных грибах *Lecanicillium muscarium*. Для детекции рекомбинантного продукта и отбора трансформантов последовательность токсина была слита на С-конце с eGFP. С целью обеспечения секреции рекомбинантного полипептида грибами к последовательности также был добавлен сигнальный пептид секреторного пути белка Mcl1 гриба *Metarhizium anisopliae*. Ген, кодирующий токсин *A. orientalis* с сигнальным пептидом белка Mcl1, был коммерчески синтезирован, амплифицирован и клонирован в составе вектора pBARGPE1, сконструированного для гетерологической экспрессии под контролем P_{gpdA} промотера и trpC терминатора *Aspergillus nidulans*. Двукратный отбор на селективной среде и микроскопический анализ трансформантов позволил получить митотически устойчивый рекомбинантный штамм *L. muscarium*. Распознавание сигнального

пептида *M. anisopliae* в клетках трансформантов и эффективная секреция гибридного продукта была подтверждена с помощью иммуноблоттинга.

Работа выполнена при поддержке министерства образования и науки РФ (Госзадание № 0483-2019-0001).

Литература:

1. Ali S., Zhang C., Wang Z., et al. Sci Rep. 2017; 7: 46558.
2. Xie M., Zhang Y.J., Zhai X.M., et al. Journal of Pest Science. 2015; 88: 637–644.

М.И. Тылец^{1,2}, О.И. Подгорная¹, Т.Г. Шапошникова²,
А.И. Соловьева¹, С.В. Шабельников¹,
А.Г. Миттенберг¹, М.А. Даугавет¹

НОВЫЙ БЕЛОК, УЧАСТВУЮЩИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ТУНИКИ АСЦИДИЙ ОТРЯДА STOLIDOBRANCHIA

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

M.I. Tyletc^{1,2}, O.I. Podgornaya¹, T.G. Shaposhnikova²,
A.I. Solovyeva¹, S.V. Shabelnikov¹,
A.G. Mittenberg¹, M.A. Daugavet¹

NEW PROTEIN INVOLVED IN THE TUNIC EXTRACELLULAR MATRIX FORMATION IN STOLIDOBRANCHIA ASCIDIANS

¹ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

masana97@yandex.ru

Ближайшей сестринской группой по отношению к хордовым животным является подтип Оболочники. Самое большое видовое разнообразие представлено в классе Асцидий. Необычной чертой их жизненного цикла является наличие свободноплавающих личинок, имеющих признаки Хордовых. Главной особенностью строения оболочников, в частности асцидий, считается наружный покров — туника. Показано, что в формировании туники у асцидии *Styela rustica* принимает участие белок морулярных клеток крови — p48. Однако механизмы процесса, природа белка и участие его в формировании туники остаются неисследованными. Таким образом, целью нашей работы стало описание белка p48, участвующего в формировании внеклеточного матрикса туники у асцидий семейств Styelidae и Pyuridae.

Методом масспектрометрии определили аминокислотную последовательность пептидов, входящих в состав p48 асцидии *Styela rustica*. Сравнение пептидов с известными родственными последовательностями показало, что p48 содержит два консервативных функциональных домена: тирозиназный и тромбоспондиновый. Поиск в транскриптомных базах данных асцидий *Styela canopus*, *Styela clava*, *Styela plicata* и *Halocynthia aurantium* определил гомологи p48. Общей характеристикой этих последовательностей является наличие двух вышеупомянутых консервативных доменов. Гомологи p48 асцидий *S. canopus*, *S. clava* начинаются с сигнального пептида и содержат еще два Ca-связывающих EGF-домена. Белки асцидий *S. plicata* и *H. aurantium* не имеют сигнального пептида и содержат только тирозиназный и тромбоспондиновый домены.

С помощью антител к р48 мы обнаружили его родственные белки в пределах одного вида. У асцидии *S. rustica* это белок с молекулярной массой 26 кДа во фракции модулярных клеток крови. У *H. aurantium* выявлены белки во фракции модулярных клеток с молекулярной массой 48 кДа, 26 кДа, 35 кДа, а также во фракции гиалиноцитов с массой 26 кДа. Методом масспектрометрии были определены пептиды этих белков. Дальнейший анализ аминокислотных последовательностей показал, что в них содержится один (тирозиновый) или два (тирозиновый и тромбоспониновый) функциональных домена.

Белок р48 и его гомологи, таким образом, могут иметь два полноразмерных функциональных домена. Тирозиновый домен участвует в формировании тирозиновых сшивок между белками внеклеточного матрикса и входит в состав фермента фенолоксидазы, вовлеченного в формирование покровов у беспозвоночных. Тромбоспониновый домен участвует в широком спектре процессов, направленных на модуляцию межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий.

Основываясь на результатах проделанной работы можно предположить, что белок р48 играет роль фермента фенолоксидазы, участвуя в процессе формирования туники, и является регулятором межклеточных взаимодействий.

Работа выполнена в рамках грантов РФФИ (19-34-80032) и РФФИ (19-74-20102).

Д.А. Федоров^{1,2}

БОРЬБА С ЛОЖНООТРИЦАТЕЛЬНЫМИ РЕЗУЛЬТАТАМИ ПРИ ПОИСКЕ ГЕНОТИПОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ДОЛГОЛЕТИЕМ (НА ПРИМЕРЕ NOS3-INTRON-4-VNTR)

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

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

D.A. Fedorov^{1,2}

THE FIGHT AGAINST FALSE-NEGATIVE RESULTS IN THE SEARCH FOR GENOTYPES ASSOCIATED WITH LONGEVITY (FOR EXAMPLE NOS3-INTRON-4-VNTR)

¹ St. Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

² St. Petersburg State Marine Technical University, Saint-Petersburg, Russia

iilhj@yandex.ru

При поиске генотипов ассоциированных с долголетием исследователи обычно разделяют испытуемых из одной популяции на две или три группы по возрасту, например, на новорожденных, лиц среднего возраста и старых, а далее ищут статистически значимые различия между частотами генотипов и (или) аллелей между этими группами. (См., например, [1]) Некоторые исследователи разделяют группу наиболее пожилых обследуемых ещё и на подгруппы: в работе [1] группа лиц старше 69 лет подразделялась на 3 подгруппы: лиц от 69 до 74 лет, от 75 до 89 лет и старше 90 лет. Иногда различия ищут между частотами сочетаний генотипов. Проводится также анализ соответствия распределений частот генотипов закону Харди-Вайнберга. При сравнении групп учитываются различия по полу обычно лишь тогда, когда распределение генотипов для лиц

женского и мужского пола различно. Чаще всего при этом отвергнуть нулевую гипотезу о равенстве между частотами генотипов в исследуемых выборках не удаётся. При этом обычно делается вывод об отсутствии ассоциации с долгожительством, что не всегда верно. Автором разработано два метода уменьшения вероятности ложноотрицательных результатов, которые были протестированы на базе данных к [1]. При этом оба метода включали в себя принцип: всегда проводить не только анализ данных для мужчин и женщин вместе, но и в отдельности.

Один метод был основан на нахождении целесообразной для сравнения с выборкой новорожденных выборки [2], другой использовал G-критерий знаков. Оба метода показали высокодостоверную ассоциацию генотипа 5./5 27bp VNTR intron4 гена *NOS3* с долголетием у мужчин (но не у женщин) Северо-западного региона России, что опровергло предположение об отсутствии такой ассоциации сделанное в [1].

В заключение следует сказать, что вероятность ложноотрицательных результатов при анализе малых и средних групп традиционными методами слишком велика, но более детальный, хотя и очень простой, статистический анализ результатов исследования таких групп может помочь сэкономить экспериментаторам значительное время и деньги.

Литература:

1. Глотов О.С. Анализ полиморфизма генов сердечно-сосудистой системы и системы детоксикации в различных возрастных группах Санкт-Петербурга. Дисс. на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Санкт-Петербург, 2007.
2. Федоров Д. А. В МИРЕ НАУЧНЫХ ОТКРЫТИЙ. 2015; 12(72): 274–283.

А.С. Федосова¹, Н.Н. Шипилова²

ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТА ПАЦИЕНТОВ НА ДОФАМИНЕРГИЧЕСКУЮ ТЕРАПИЮ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

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

² ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

A.S. Fedosova¹, N.N. Shipilova²

PHARMACOGENETICS OF RESPONSE TO DOPAMINERGIC THERAPY IN PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

annetfedosova@yandex.ru

Среди немоторных симптомов (НМС) болезни Паркинсона (БП) часто встречаются импульсивно-компульсивные расстройства (ИКР), которые имеют несомненное социальное-экономическое значение как для пациента, так и для его окружения. Для исследования представляет интерес роль полиморфных вариантов генов *DBH* (rs141116007, rs1611115, rs6271),

MAOA (VNTR), *DRD2* (rs6275, rs1799732) и *BDNF* (rs2049046 и rs6265) в развитии ИКР у пациентов с БП на фоне дофаминовой терапии [1,2].

Исследование проводилось на образцах ДНК пациентов с БП, длительное время получавших дофаминовую терапию, с развившимся ИКР (n=50) и без ИКР (n=36). Пациенты обследовались в ГКБ№1 им. Н.И. Пирогова и консультативном кабинете по экстрапирамидной патологии ОНО ЦАО г. Москвы. Биоматериал — образцы крови — были собраны квалифицированным флебологом. Данный этап работы был выполнен под руководством к. м. н., врача-невролога Титовой Н. В. В качестве внешнего контроля использовались данные о генотипах 365 необследованных жителей Москвы и МО. Из образцов была выделена ДНК, оценку генотипа проводили методом ПЦР-ПДРФ.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ WinPeri и APSampler 3.6. Достоверными считали результаты со значением $p < 0,05$ по критерию Фишера.

В результате проведенного исследования выявлен генетический фактор риска, влияющий на развитие ИКР у пациентов с БП после длительной дофаминовой терапии, — доминантный аллель С замены rs6275 в гене *DRD2* ($p=0.026$, $OR=2.85$, $CI_{95\%} [1.04-7.81]$). Значимых ассоциаций с ИКР для других исследованных замен выявлено не было. Данный результат является приоритетным, однако требует проверки на независимой выборке.

Литература:

1. De Lau L. M. L., Breteler M. M. B. The Lancet Neurology. 2006; 5(6): 525–535.
2. Weintraub D., Siderowf A.D., Potenza M.N. et al. Archives of neurology 2006; 63(7): 969–973.

А.А. Хмелевская, Н.А. Быкова, Г.А. Ефимов

T-КЛЕТочный ОТВЕТ НА ИММУНОДОМИНАНТНЫЕ МИНОРНЫЕ АНТИГЕНЫ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

ФГБУ НМИЦ Гематологии МЗ РФ

A.A. Khmelevskaya, N.A. Bykova, G.A. Efimov

T-CELL RESPONSE TO IMMUNODOMINANT MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

a.khmel.bio@gmail.com

Злокачественные заболевания крови являются серьезной проблемой из-за высокой смертности. Для лечения острых лейкозов применяется трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Успешность трансплантации определяется наличием и силой иммунного ответа против оставшихся после химиотерапии раковых клеток пациента — реакция «трансплантат против опухоли» (РТПО). Однако, клетки донора могут атаковать здоровые клетки пациента, что приводит к основному осложнению алло-ТГСК — реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Мишенями ответа в этом случае являются пептиды, представленные на клетках пациента — минорные антигены

гистосовместимости (МАГ). Появление таких пептидов обусловлено существованием в геноме несинонимичных полиморфизмов. Согласно литературным данным, наиболее клинически значимыми для противоопухолевого ответа являются МАГ HA-1 и HA-2. Иммуногенное несоответствие по этим МАГ между донором и пациентом является положительным прогностическим фактором исхода алло-ТГСК.

Разнообразие вариантов T-клеточных рецепторов (ТКР), формирующихся в процессе V(D)J-рекомбинации, велико. Однако, обнаруживается большое количество «публичных» последовательностей ТКР, которые встречаются более, чем у одного человека. Это объясняется конвергентной рекомбинацией: последовательности ТКР, распознающие один и тот же антиген, могут полностью совпадать или быть схожими. Биоинформатический анализ полного репертуара ТКР позволяет выявить последовательности, схожие с описанными ранее, и может быть использован для детекции иммунного ответа на данный антиген.

В ходе работы при помощи NGS-секвенирования T-клеточных экспансий были получены 95 последовательностей ТКР, специфичных к HA-1 и 66 к HA-2. Нами было показана взаимная схожесть последовательностей ТКР одной специфичности. Согласно метрике, основанной на построении графов, альфа-цепи специфичные к HA-2 имеют достоверно более высокую степень схожести, чем рецепторы к другим МАГ и вирусным антигенам. Полученная база последовательностей ТКР использовалась для детекции иммунного ответа на HA-1 и HA-2 у пациентов после алло-ТГСК через поиск схожих последовательностей в тотальном репертуаре ТКР. Было показано, значимо повышенное число альфа-цепей ТКР специфичных к HA-2 и альфа- и бета-цепей специфичных к HA-1 у пациентов, имеющих соответствующие иммуногенные несоответствия с донором.

А.В. Цуканов¹, В.Г. Левицкий^{1,2}

ПОИСК СКРЫТЫХ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ДАННЫХ CHIP-SEQ

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

A.V. Tsukanov¹, V.G. Levitsky^{1,2}

IDENTIFICATION OF HIDDEN TRANSCRIPTION FACTOR BINDING SITES IN CHIP-SEQ DATA

¹ Institute of cytology and genetics, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk state university, Novosibirsk, Russia

anton.v.tsukanov@yandex.ru

Ключевыми компонентами регуляции экспрессии генов являются особые белки — транскрипционные факторы (ТФ), которые связываются со специфическими сайтами на ДНК. В настоящее время для поиска сайтов связывания ТФ (ССТФ) используется ChIP-seq. Данный эксперимент позволяет выявлять участки ДНК, так называемые пики, где ТФ возможно был напрямую связан с ДНК. Далее проводят de novo поиск ССТФ в пиках, для этого чаще всего в качестве модели используют позиционную весовую матрицу (ПВМ) [1], однако, ПВМ находит ССТФ не во всех пиках. Отсутствие ССТФ в основном объясняют тем, что: 1) в части пиках изучаемый ТФ мог

быть связан с ДНК опосредовано через другой ТФ; 2) присутствие «горячих» участков, регионы ДНК с которыми связываются все ТФ в отсутствии сайтов связывания [2–3]. Тем не менее проблема поиска ССТФ в пиках изучена не до конца, так как модель ПВМ не учитывает зависимостей между нуклеотидами в ССТФ.

К настоящему времени были предложены альтернативные модели de novo поиска ССТФ, такие как VaMM и InMoDe, которые учитывают зависимости между нуклеотидами на близком расстоянии (от 1 до 5 нуклеотидов), а также Slim и SiteGA, которые учитывают зависимости между нуклеотидами на любых расстояниях. Данные модели не получили большого распространения, хотя и было показано, что альтернативные модели могут иметь более высокую точность, чем ПВМ.

Мы разрабатываем конвейер программ, который единообразно обучает модели, определяет их точность при помощи bootstrap, единообразно выставляет пороги, осуществляет поиск ССТФ в пиках и сопоставляет результаты разных моделей. На данный момент интегрированы следующие модели: ПВМ, VaMM, InMoDe, SiteGA. В дальнейшем планируется провести массовый анализ данных ChIP-seq.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-29-13040 и бюджетным проектом 0259-2019-0008-С-01.

Литература:

1. Heinz S. et al. Mol. Cell. 2010; 38(4): 576–589.
2. Srivastava D., Mahony S. Biochimica et Biophysica Acta — Gene Regulatory Mechanisms. Elsevier B.V. 2019.
3. Wreczycka K. et al. Nucleic Acids Res. 2019; 47(11): 5735–5745.

П.Д. Чеснокова¹, Е.А. Ковтунов²,
Н.С. Величко³, А.С. Комиссаров¹

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ОПЕРОНОВ О-АНТИГЕНА В ГЕНОМЕ HERBASPIRILLUM FRISINGENSE

¹ Лаборатория прикладной геномики, SCAMT,
Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² Лаборатория молекулярной робототехники
и биосенсорных материалов, SCAMT, Университет
ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

P.D. Chesnokova¹, E.A. Kovtunov²,
N.S. Velichko³, A.S. Komissarov¹

FEATURES OF O-ANTIGEN OPERONS STRUCTURAL ORGANIZATION IN HERBASPIRILLUM FRISINGENSE GENOME

¹ Applied Genomics Laboratory, SCAMT Institute, ITMO
University, Saint Petersburg, Russia

² Molecular Robotics and Biosensor Materials
Laboratory, SCAMT Institute, ITMO University, Saint
Petersburg, Russia

³ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants
and Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
Saratov, Russia

chesnokova@scamt-itmo.ru

Симбиоз растений с азотфиксаторами является широко известным, но недостаточно изученным феноменом. Особенно мало внимания уделяется изучению

состава структур, обеспечивающих взаимодействие растение-микроорганизм.

В качестве объекта исследования мы выбрали представителя рода *Herbaspirillum*. Этот род наиболее перспективен с точки зрения его потенциально высокой способности к фиксации азота, а также к продукции ряда веществ, в том числе фитогормонов, стимулирующих рост и развитие растений.

Одной из ключевых структур, определяющих молекулярные механизмы формирования такого рода симбиотических отношений, является гликополисахаридный состав наружной мембраны грамотрицательных бактерий, в том числе соматического O-антигена.

Для идентификации генов, вовлеченных в биосинтез O-антигена, мы изучили его состав у модельного объекта *Escherichia coli* O29. Также из базы данных NCBI получили референсный геном *Herbaspirillum frisingense* GSF30. Ввиду невозможности его пересборки с целью повышения качества мы также взяли файлы, содержащие риды ближайшего из доступных родственных организмов — *Herbaspirillum* sp. SJZ107. В ходе изучения структуры модельного O-антигена выяснилось, что он содержит 12 генов. Они послужили ключевыми элементами для идентификации кластера O-антигена у гербаспириллы. Из ридов с использованием SPAdes был собран референсный геном более высокого качества. Сборку проанотировали в Prokka, после чего выявили границы оперонов, используя веб-сервис Operon-Mapper.

Анализ Operon-Mapper показал, что геномы гербаспириллы содержат набор последовательно расположенных оперонов, связанных с O-антигеном. Мы обнаружили 2587 оперонов в *Herbaspirillum frisingense* GSF30 и 3148 оперонов в *Herbaspirillum* sp. SJZ107, включающих 15 и 23 оперона, содержащих гены биосинтеза O-антигена, соответственно. Всего было обнаружено 25 ведущих генов, связанных с продукцией O-антигена и 39 вспомогательных, также входящих в состав оперонов.

Анализ выявленных последовательностей O-антигена, проведенный в BLAST, продемонстрировал специфичность этого кластера для рода гербаспириллы.

М.А. Шилина, Л.Л. Алексеенко, И.В. Кожухарова,
О.Г. Люблинская, Т.М. Гринчук

НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА ФИБРОБЛАСТОВ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА В КУЛЬТУРЕ, ВЫЗВАННАЯ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ОБРАБОТКОЙ ПОЛИАЛЛИЛАМИНОМ СОХРАНЯЕТСЯ У ПОТОМКОВ

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

M.A. Shilina, L.L. Alekseenko, I.V. Kozhukharova,
O.G. Lyublinskaya, T.M. Grinchuk

INSTABILITY OF THE CHINESE HAMSTER FIBROBLASTES GENOME IN CULTURE CAUSED BY POLYALLYLAMINE TREATMENT IS SAVED IN PROGENY

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

Shili-mariya@yandex.ru

Разработка искусственных биополимерных носителей для адресной доставки лекарственных препаратов является новым этапом в развитии биотехнологии. Одним из таких носителей является водорастворимый синтетический полимерный катион полиаллиламин (ПАА).

ПАА используется в формировании микрокапсул, для доставки медицинских препаратов, участвует в образовании многослойных пленок, покрывающих биомедицинские имплантаты. Однако на данный момент многое о влиянии ПАА на клетки до сих пор не известно, в частности его влияние на клеточный геном. Настоящую работу проводили на фибробластах китайского хомячка CHLV-79 RJK (RJK). Ранее нами было показано, что обработка клеток RJK ПАА в сублетальной концентрации (100 мкг/мл) приводит к вспышке кариотипической нестабильности. Выявленная кариотипическая нестабильность носила случайный характер и была связана с делециями и изменением копийности по тем или иным хромосомам набора. В настоящей работе представило интерес проанализировать потомков клеток, переживших воздействие ПАА и продолживших свою пролиферацию. В качестве метода цитогенетического анализа было использовано кариотипирование G-бандированных метафазных хромосом. Цитогенетический анализ потомков на 4-м пассаже после воздействия ПАА показал, что клетки сохранили кариотипическую нестабильность, однако наблюдалась тенденция к неслучайному вовлечению определенных хромосом в перестройки. В перестройки неоднократно была вовлечена 1/3 кариотипического набора. Полученные данные позволяют говорить о тенденции клеток, родители которых были под влиянием ПАА, к селективному отбору. Дальнейший анализ показал, что кариотипическая нестабильность потомков, переживших воздействие ПАА сопровождается изменениями в экспрессии генов *p53*, *top2a*, *hsp90*, *hsc70*. Повышение уровня опухолевого супрессора *p53*, снижение экспрессии *hsp* и *topo2* свидетельствует о снижении их устойчивости к воздействию ядам. Это предположение подтверждает повышение чувствительности этих клеток к токсическому действию доксорубина (показано методами МТТ и клонированием). Исходя из результатов проведенной экспериментальной работы следует, что обработка клеток ПАА вызывает вспышку геномной нестабильности с неслучайным вовлечением определенных хромосом набора, сохраняющуюся в потомках. В следствии этого использование синтетических биотранспортеров в медицинских целях требует тщательного предварительного изучения их токсичности, в том числе с использованием цитогенетических и молекулярных методов.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-04-00994

А.С. Штомпель, А.В. Маслова, А.В. Красикова
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ И АНАЛИЗ 3D-РАССТОЯНИЙ
ЛОКУСОВ ИЗ ТОПОЛОГИЧЕСКИ-
АССОЦИИРОВАННЫХ ДОМЕНОВ
В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ КУРИЦЫ

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

A.S. Shtompel, A.V. Maslova, A.V. Krasikova
IMAGING AND 3D-MEASUREMENTS OF LOCI
FROM TOPOLOGICALLY ASSOCIATED DOMAINS
IN CHICKEN SOMATIC CELLS

*Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg,
 Russia*

anastasiya.shtompel@mail.ru

Текущий прогресс в исследовании трехмерной организации генома обеспечивается развитием методов флуоресцентной визуализации районов генома (FISH) и методов захвата конформации хроматина (C-методов). Полногеномный вариант захвата фиксации хроматина (HiC) оценивает частоту пространственных контактов двух произвольных локусов в геноме, но не физическое расстояние между ними, для большой популяции клеток. FISH, наоборот, позволяет провести измерение 3D-расстояний между локусами интереса, мечеными флуоресцентными зондами, в ядре отдельной клетки, но обладает ограниченной пропускной способностью по количеству одновременно анализируемых клеток. Несмотря на то, что оба метода оперируют разными типами данных, показано, что частота контактов локусов и расстояние между ними в пространстве ядра, в целом, коррелируют между собой. С другой стороны, последние исследования нанодоменов хроматина в клетках млекопитающих и дрозофилы с применением FISH и микроскопии сверхвысокого разрешения показали высокую вариабельность 3D-расстояний между локусами, находящимися в доменах хроматина, отличающихся повышенной частотой HiC контактов — так называемых топологически-ассоциированных доменах (ТАД). Данную вариабельность необходимо учитывать, как при верификации методом FISH взаимодействий хроматина, выявляемых с помощью HiC, так и при исследовании изменения субструктуры ТАД в процессе дифференцировки или в разных типах клеток.

В настоящей работе мы использовали FISH с зондами на основе ВАС-клонов для верификации взаимодействий хроматина на уровне ТАД, идентифицированных нами ранее в ядрах эмбриональных фибробластов курицы [1], а также анализа вариабельности 3D-расстояний между локусами, линейно равноудаленными в геноме в ядрах трансформированных клеток крови курицы (HD3, DT40). С учетом размера геномной вставки в ДНК ВАС-клонов (182 ± 36 т.п.н) и ограничений в разрешающей способности оптической микроскопии для анализа были выбраны локусы, геномное расстояние между которыми составляло 600–700 т.п.н. Относительно геномных координат ТАД локусы были выбраны таким образом, что из трех локусов по крайней мере один был отделен от остальных границей ТАД. Многоцветная FISH позволила одновременно визуализировать и измерить расстояние между тремя последовательными локусами, находящимися в шести разных районах крупных ТАД макрохромосом 1, 2, 4 и микрохромосомы 14 курицы. Полученные результаты дают представление о вариабельности пространственных взаимодействий в масштабе ТАД в клетках курицы и полезны в дальнейших работах по визуализации ТАД с помощью олигонуклеотидных зондов и микроскопии сверхвысокого разрешения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-74-20075 с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета.

Литература:

1. Fishman V., Battulin N., Nuriddinov M. et al. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (2): 648–665.

В.Д. Щербинина

ДЕСТАБИЛИЗАЦИЯ ГЕНОМА ПОЛОВЫХ КЛЕТОК САМЦОВ МЫШЕЙ ПРИ ОЛЬФАКТОРНОМ СТРЕССЕ

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

V.D. Shcherbinina

GENOME DESTABILIZATION IN GERM CELLS OF MOUSE MALES UNDER PHEROMONAL STRESS

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

shcherbinina.veronika2014@yandex.ru

С.И. Якушов, В.В. Косенчук, И.В. Уласов
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ BECLIN-1 И BECLIN-2 В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ ПРИ ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛИ И ПРИ ОТВЕТЕ НА ТЕРАПИЮ

ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова МЗ Российской Федерации

S.I. Yakushov, V.V. Kosenchuk, I.V. Ulasov

INTERACTION OF BECLIN-1 AND BECLIN-2 IN GLIOBLASTOMA CELLS DURING TUMOR PROGRESSION AND RESPONSE TO THERAPY

Sechenov First Moscow State Medical University Ministry of Health of the Russian Federation

sem.yakushov@gmail.com

Удобной моделью для изучения социально-индуцированных стрессов, с которыми сталкивается современный человек, является ольфакторное воздействие на мышей хемосигналами, которые выделяются стрессированными особями. Одним из таких веществ является 2,5-диметилпиразин — феромон, выделяемый с мочой самками в условиях переуплотненного содержания, и оказывающий множество негативных эффектов на репродуктивную систему особей-реципиентов, среди которых: торможение полового созревания молодых животных обоих полов, снижение массы препуциальных желез, семенных пузырьков и семенников [1]. Известно также, что после феромонального воздействия повышается частота хромосомных aberrаций в митотически и мейотически делящихся клетках, и частота аномалий головок спермиев [2]. Однако события, предшествующие перестройкам и дезинтеграциям генома половых клеток стрессированных животных, остаются неизвестными. Одним из возможных механизмов является возникновение в интерфазных ядрах щелочно-лабильных сайтов, доступных для атаки молекулами, нарушающими целостность ДНК. Для обнаружения присутствия таких сайтов используют метод щелочного кометного фореза единичных клеток.

Впервые было показано, что двухчасовое стрессирование 0,01% раствором 2,5-диметилпиразина вызывает через 2 часа увеличение доли поврежденных клеток семенников мышей линии CD1, выявляемых методом щелочного кометного фореза *in situ*, с $27.18 \pm 1.895\%$ ($M \pm SED$) у контрольных животных ($N=5$) до $51.04 \pm 2.985\%$ у стрессированных самцов ($N=6$) (t test $p=0,0001$).

Таким образом, ольфакторное воздействие социально-значимыми хемосигналами приводит к изменению функционирования и даже перестройке хромосомного аппарата половых клеток самцов мышей, что негативно сказывается на репродукции.

Изучение возможностей стрессоров социальной природы изменять стабильность генома половых клеток особенно важно, так как последствия данных воздействий могут затрагивать несколько поколений и изменять структуру популяции [3].

Литература:

1. Jemiolo B., Novotny M. *Physiol. & Behav.* 1994; 55: 519–522.
2. Даев Е.В. Генетические последствия ольфакторных стрессов у мышей. Дисс. докт. наук. СПб: СПбГУ. 2006.
3. Daev E. *Biological Communications.* 2019; 64(2): 158–165.

Глиобластома считается наиболее агрессивной и часто встречающейся раковой опухолью головного мозга. Несмотря на своевременную и максимально возможную терапию опухоль обычно рецидивирует. Аутофагия значима в формировании вторичных рецидивов глиобластомы, а также является одним из типов клеточной смерти, вызываемой темозоломидом.

Важную роль в регуляции аутофагии играют белки-паралоги Beclin1 и Beclin2. Экспрессия генов *BECN1* и *BECN2* напрямую регулируют процессы, связанные с аутофагией внутри клетки. Высокий уровень экспрессии *BECN1* способствует положительному ответу на лечение дифференцированной глиобластомы темозоломидом. Beclin1, основной регулирующий фактор аутофагии, отвечает за нуклеацию аутофагосом, посредством связывания с PI3K3. Благодаря схожести с Beclin1 строению и наличию домена CCD Beclin2 способен связываться с комплексом PI3K3, а также с другими белками, регулирующими аутофагию и непосредственно с самим Beclin1. Функции, которые при этом выполняет Beclin2 аналогичны, но отличаются в деталях. Так же Beclin2 является регулятором апоптоза.

Ранее было проведено иммуногистохимическое исследование уровня Beclin1 в образцах первичной глиобластомы с различной степенью злокачественности в сравнении с нормальной тканью головного мозга. Мы провели аналогичное исследование для Beclin2 и получили схожие результаты: в раковых клетках при второй и четвертой степенях злокачественности уровни Beclin1 и Beclin2 гораздо выше в сравнении с нормальной тканью головного мозга.

Для определения базального уровня Beclin2, мы провели вестерн блот клеток глиобластомы линии U87 в присутствии темозоломида. Нами показано, что уровень Beclin2 падает при лечении клеток темозоломидом и с ростом его концентрации. Эти данные имеют обратную корреляцию с аналогичными для Beclin1.

Далее мы провели вестерн блот анализ лизатов клеток глиобластомы U118 линии после их трансфекции антисмысловой РНК к Beclin1. Результаты показали, что уровень Beclin2 ассоциировано падает.

Исходя из вышесказанного можно утверждать о взаимосвязи между уровнями этих белков и то, что их взаимодействие в первичной ткани глиобластомы и при лечении темозоломидом отличны. Нам предстоит проверить, как клетки реагируют на терапию темозоломидом при повышенной экспрессии генов *BECN1* и *BECN2*, исходя из взаимного взаимодействия их белков друг на друга.

14 ОКТЯБРЯ 2020

НЕЙРОБИОЛОГИЯ

Р.Р. Гайнетдинов

**ТРАНСГЕННЫЕ МОДЕЛИ
В ТРАНСЛЯЦИОННОЙ БИМЕДИЦИНЕ***Санкт-Петербургский государственный университет,
Институт Трансляционной Биомедицины СПбГУ,
Санкт-Петербург, Россия*

R.R. Gainetdinov

**TRANSGENIC MODELS IN TRANSLATIONAL
BIOMEDICINE***Institute of Translational Biomedicine Saint-Petersburg
State University, Saint-Petersburg, Russia*

gainetdinov.raul@gmail.com

Одним из критических компонентов исследований в области трансляционной медицины является трансляция накопленных знаний по этиологии и патологии заболеваний полученными разнообразными методами, включающими в том числе генетический и протеомный анализ, в экспериментальные модели заболеваний человека на животных. В свою очередь, последующее изучение на этих моделях патологических процессов, идентификация потенциальных мишеней для терапевтического воздействия и поиск новых лекарственных средств должны транслироваться клинику в виде новых методов терапии. Таким образом, проблема создания наиболее адекватных экспериментальных моделей заболеваний человека на животных рассматривается как приоритетная в медицинских исследованиях. В связи с тем, что мыши, крысы, и люди имеют около 99% общих генов, грызуны являются прекрасной моделью для изучения функций человеческих генов и патологий. Манипулирование с их генами позволяет моделировать многие заболевания, описанные у человека. В ближайшие годы, использование генетически модифицированных мышей в качестве моделей болезней человека (с учетом определенных ограничений ввиду межвидовых различий) будет оставаться передовой областью исследований в доклинической фармакологии. Недавно появившаяся возможность создавать генетически модифицированных крыс является дополнительным фактором, который значительно повышает научную новизну и значимость этого направления. Будут представлены результаты исследований на трансгенных экспериментальных моделях нейropsychиатрических заболеваний, созданных в последние годы на основе направленных генетических изменений в ключевых компонентах дофаминовой, серотониновой и глутаматной систем мозга. Кроме того, будет показано применение трансгенных животных для понимания функции и фармакологии рецепторов следовых аминов TAARs.

Э.Д. Гатаулина¹, В.И. Шахматова¹,
С.А. Дмитриева², Г.Ф. Ситдикова¹, А.В. Яковлев¹**ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗВИТИЯ
ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА
В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА
У КРЫС С ПРЕНАТАЛЬНОЙ
ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ**¹ *Казанский федеральный университет, Казань,
Россия*² *Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ
«Казанский научный центр РАН», Казань, Россия*E. Gataulina¹, V. Shakhmatova¹,
S. Dmitrieva², G. Sitdikova¹, A. Yakovlev¹**THE DEVELOPMENT OF OXIDATIVE STRESS
IN THE BRAIN TISSUES IN RATS WITH
PRENATAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA**¹ *Kazan Federal University, Kazan, Russia*² *Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan, Russia*

maileen2013@yandex.ru

Известно, что окислительный стресс в пренатальном периоде вызывает нейровоспаление и апоптоз клеток с последующей задержкой роста плода и нарушениями развития в постнатальном периоде жизни (Blaise et al 2007). Показано, что гомоцистеин индуцирует окислительный стресс, продуцируя внутриклеточные супероксидные радикалы, а также вызывает угнетение антиоксидантных ферментов (Petras et al., 2014). Целью исследования было анализ изменений уровня малонового альдегида и перекиси водорода различных отделах ЦНС у крысят с пренатальной гипергомоцистеинемией. С помощью биохимических методов определялись уровень H₂O₂ и МДА, продукта распада перекисного окисления липидов, на первой, второй постнатальной недели в гиппокампе, коре, мозжечке и стволе мозга. В экспериментах использовались 2 группы: контрольная группа (уровень гомоцистеина в плазме 5.9±0.5 мкМ) и потомство с пренатальной гипергомоцистеинемией (22.1±1.5 мкМ).

В течение первых недель жизни уровень H₂O₂ в контрольной группе составил — 2.8 ± 0.3, 1.98 ± 0.22, 2.6 ± 0.28 и 2.1 ± 0.15 мкг/г (N=12), соответственно, в гиппокампе, коре, мозжечке и в стволе головного мозга крыс. У животных в первую постнатальную неделю с пренатальной гипергомоцистеинемией наблюдалось увеличение содержания H₂O₂ в гиппокампе до 4.7 ± 0.7 мкг/г (p<0.05), в стволе мозга до 2.7 ± 0.2 мкг/г (p<0.05), и в мозжечке до 4.5 ± 0.7 мкг/г (N=12, p<0.05). В тоже время содержание H₂O₂ в коре головного мозга достоверно не отличалось от контроля.

Аналогичные результаты были получены и в других возрастных группах. На второй неделе жизни и у взрослых экспериментальных животных содержание H₂O₂ возрастало, как в мозжечке, гиппокампе и стволе мозга, так в коре головного мозга. Наблюдалось 1.5–2х кратное увеличение уровня H₂O₂ в различных структурах мозга. Так уровень перекиси водорода в клетках гиппокампа и в коре на второй неделе постнатального развития увеличился на 85±8.4% (N=23, p<0.05) и 12.7±22.9%

($N=18$, $p<0.05$), соответственно, относительно контроля. Анализ ферментативной активности глутатион-пероксидазы (GPx) и супероксид дисмутазы (SOD) в гомогенате тканей головного мозга крыс показал значительное их снижение только на второй недели постнатального развития. Аналогичные результаты были получены при анализе активности глутатион-пероксидазы (GPx) у животных с пренатальной гипергомоцистеинемией. В остальных возрастных группах наблюдалось не достоверное снижение активности ферментов по отношению к контрольным значениям.

Таким образом, установлено, что в условиях пренатальной гипергомоцистеинемии клетки мозжечка и гиппокампа наиболее подвержены действию оксидативного стресса, интенсивность которого сохраняется на всем протяжении постнатального периода развития мозга.

Работа поддержана грантом РФФИ: 18-015-00423.

Д.Н. Голубева¹, А.В. Чижов^{1,2}, С.Л. Малкин²
МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ
ВЛИЯНИЯ ТРАНСПОРТЕРОВ ГЛУТАМАТА
ЕААТ2 НА ПОСТСИНАПТИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ
В ГИППОКАМПАЛЬНЫХ СРЕЗАХ

¹ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

D.N. Golubeva¹, A.V. Chizhov^{1,2}, S.L. Malkin²
MATHEMATICAL MODELING OF GLUTAMATE
TRANSPORTER EAAT2 EFFECTS ON POST-
SYNAPTIC SIGNALS IN HIPPOCAMPAL SLICES

¹ Institute of Physics and Technology A.F. Ioffe RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry I.M. Sechenov RAS, Saint-Petersburg, Russia

daria.10281615@gmail.com

Эпилепсия является одним из самых распространенных заболеваний в неврологии. Одним из факторов, приводящих к нарушению баланса возбуждения и торможения при эпилепсии, может быть недостаточно эффективный обратный захват глутамата из внеклеточного пространства, поэтому перспективным решением может быть воздействие на переносчики глутамата. Для изучения влияния транспортера EAAT2 на постсинаптические сигналы мы регистрировали фармакологически изолированные синаптические токи через AMPA и NMDA-рецепторы в пирамидных клетках поля CA1 гиппокампа в ответ на стимуляцию коллатералей Шаффера в срезах головного мозга крысы. Эти ответы объясняются и воспроизводятся с помощью математического моделирования.

При попадании в синаптическую щель глутамат воздействует на AMPA и NMDA-рецепторы, пока не устраняется астроцитарным транспортером EAAT2 и, в меньшей степени, нейрональными переносчиками. При блокаде рецепторов наблюдается снижение эффективности работы EAAT2, что ведет к нарушению откачивания глутамата из синаптической щели.

Было обнаружено, что фармакологическая блокада транспортеров EAAT2 не изменяла кинетику токов через AMPA-рецепторы, в то время как фаза спада

NMDA-опосредованных токов значительно замедлялась по сравнению с контролем.

Математическая модель включает в себя: двухкомпарментную модель нейрона, включающую в себя два дифференциальных уравнения для дендритного и соматического мембранных потенциалов; дифференциальное уравнение второго порядка для проводимости рецепторов (NMDA или AMPA); два релаксационных уравнения для концентрации глутамата в синаптической щели и во внеклеточном пространстве с учетом работы транспортера EAAT2; а также уравнение пресинаптической фасилитации.

Данная модель качественно отражает экспериментально наблюдаемые эффекты. Для воспроизведения результатов оказалось необходимым учитывать:

- не только соматический, но и дендритный компартменты;
- синаптическую фасилитацию;
- затрудненную диффузию между синаптической щелью и остальным внеклеточным пространством;
- разный порог чувствительности к глутамату у AMPA- и NMDA-рецепторов.

Модель предсказывает, что обратному захвату глутамата транспортерами необходимо предшествует выход нейромедиатора посредством диффузии из синаптической щели в экstrasинаптическое экstrasклеточное пространство. Менее чувствительные AMPA-рецепторы действуют на временах до пространственного выравнивания концентрации глутамата, тогда как более чувствительные NMDA-рецепторы действуют до тех пор, пока эта концентрация не оказывается сниженной действием транспортёров и смешением с омывающим среза раствором.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-10201-П).

О.В. Градов

МОДЕЛИ ДИАГРАММ НАПРАВЛЕННОСТИ
В РЕКОНСТРУКЦИЯХ АКСОНАЛЬНОГО
НАВЕДЕНИЯ ВО ВНЕШНЕМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ
ПОЛЕ

ФИЦ ХФ РАН, Москва, РФ

O.V. Gradov

RADIATION PATTERN MODELS FOR FIELD-
INDUCED AXONAL GUIDANCE PROCESSES

Semenov Institute of Chemical Physics, Moscow, Russia

o.v.gradov@gmail.com

Вопросы о структурной организации мозга не могут решаться в отрыве от его функции — биоэлектрической активности, поэтому выделение модулей и других архитектурных образований лишено всякого смысла в случае чисто морфологической их идентификации, не сопровождающейся анализом электрического взаимодействия в выделяемом ансамбле. Часто при визуальном и даже машинном определении может казаться, что произвольная близкорасположенная группа клеток входит в один и тот же ансамбль (например, модуль / колонку), однако при всем этом, с электрофизиологических позиций, они не вовлечены в передачу сигнала, так как не имеют общих силовых линий, по которым распространяется сигнал (они же изолинии форетического

распределения сигнальных молекул). Неочевиден ответ на вопрос: почему морфогенез нейронов приводит к ветвлению, несмотря на то, что оно характеризует весьма неравновесную форму морфогенеза, а основная масса клеток в организме неспособна образовывать протяженные отростки (в силу действия принципа минимальной поверхности, поверхности наименьшей энергии). Если характерная форма поверхности недифференцированной клетки близка к сферической, формирование любых деформаций относительно этого стабильного состояния требует энергетических вложений в направлении, соответствующем направленности морфогенеза и активизации функций на данном направлении, требующей затрат цитозелектрофизиологической энергии. К тому же, почему отростки направлены в пространстве (пример тому аксональное наведение), хотя, с точки зрения биофизической химии, диффузия секреторируемых сигнальных молекул от сферической клетки, каковой является нейробласт, должна происходить почти изотропно по всем направлениям? Не следует ли из этого, что распределение сигнальных молекул в пространстве регулируется направленным физическим фактором, которым не могут быть сами изотропно диффундирующие (без векторно-химического распространения в среде по Митчеллу) сигнальные молекулы?

Нами рассматривается биофизическая модель, в рамках которой морфология отдельного нейрона может рассматриваться как «диаграмма направленности» пробоя его электрофизиологического сигнала, начиная с электрического поля нейробласта. В многоклеточных ансамблях нейроцитов направление электрического поля от каждой нервной клетки регулируется и направляется состоянием электрического поля близлежащих клеток, поэтому рассматривается направленность не отдельного нейрона — источника, но диаграммы направленности приема и передачи сигнала между нейронами в создающейся сети, а ионные градиенты фиксируют при перезарядке.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-32-00914.

Д.А. Грехнёв, В.А. Вигонт, Е.В. Казначеева
ПОЛИГЛУТАМИНОВЫЕ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ:
НАРУШЕНИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ
И СЕЛЕКТИВНАЯ ГИБЕЛЬ НЕЙРОНОВ

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

D.A. Grekhnev, V.A. Vigont, E.V. Kaznacheyeva
POLYGLUTAMINE NEURODEGENERATIVE
DISEASES: DISTURBANCE OF CALCIUM
SIGNALING AND SELECTIVE VULNERABILITY
OF NEURONS

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences,
 Saint-Petersburg, Russia*

dima.grekhnev@yandex.ru

Нейродегенеративные патологии являются тяжелыми заболеваниями нервной системы, характеризующимися прогрессирующей гибелью нейронов в различных отделах мозга. Однако для каждой определенной нейродегенеративной патологии наблюдается индивидуальный паттерн гибели нейронов, сопровождающийся характерной клинической картиной заболевания. Выявление

причин селективной гибели нейронов является актуальной задачей, так как позволяет прояснить механизм патологического процесса и выявить новые потенциальные мишени для направленного действия лекарственных препаратов. В нашей работе мы исследовали три пациент-специфичные модели таких полиглутаминовых заболеваний как болезнь Хантингтона (БХ) и спиноомозжечковые атаксии 1 (СЦА1) и 17 (СЦА17) типов. Все модели представляли собой терминально дифференцированные срединные шипиковые нейроны стриатума. Мы показали, что при БХ и СЦА17 наблюдается увеличение входа кальция в клетку через потенциал- и депо-управляемые каналы. Напротив, в модели СЦА1 мы показали уменьшение депо-управляемого входа кальция (SOCE) и отсутствие изменений потенциал-управляемых токов кальция. Интересно отметить, что при БХ и СЦА17 наблюдается схожее нарушение кальциевой сигнализации, а в медицинской практике наблюдают схожие клинические картины данных патологий. Для обоих этих заболеваний наблюдается массовая гибель нейронов стриатума, что нехарактерно для СЦА1. Таким образом, нарушение кальциевой сигнализации может являться одной из причин избирательной гибели нейронов. Нарушение SOCE также является общей чертой как для ювенильной формы БХ, так и для форм с поздней манифестацией заболевания. Таким образом, белки, принимающие участие в депо-управляемом кальциевом ответе, можно рассматривать как новые потенциальные мишени для разработки лекарственных препаратов против БХ. Возможной причиной патологического увеличения SOCE является наблюдаемое нами в ювенильной модели БХ увеличение экспрессии белка-кальциевого сенсора STIM2, являющегося одним из ключевых активаторов нейронального SOCE. Более того, супрессия белка STIM2 с помощью shRNA, приводила к уменьшению SOCE до контрольных значений. Одним из перспективных лекарственных препаратов при БХ является нейропротекторное соединение EVP4593, известное как блокатор депо-управляемых каналов. Однако его точная молекулярная мишень остается неизвестной. Нами было показано, что данное соединение способно уменьшать патологически увеличенную экспрессию мутантного хантингтина и STIM2, с чем может быть связан его нейропротекторный эффект.

Работа поддержана Грантом РНФ № 17-74-20068, Грантом Президента РФ МК-2335.2019.4, Грантом РФФИ № 17-54-80006.

В.В. Гусельникова
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ
ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ
АМИЛОИДНЫХ БЛЯШЕК У ЧЕЛОВЕКА

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

V.V. Guselnikova
COMPARATIVE ANALYSIS OF HISTOLOGICAL
METHODS USED FOR IDENTIFICATION
OF AMYLOID PLAQUES IN THE HUMAN BRAIN

*Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg,
 Russia*

Guselnikova.Valeriia@yandex.ru

Амилоидные бляшки — это внеклеточные белковые агрегаты, которые могут формироваться как в ходе

нормального старения, так и при развитии некоторых нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера. Целью работы стало проведение сравнительного исследования, направленного на оценку эффективности использования разных гистологических методов для идентификации амилоидных бляшек в головном мозге у человека. Материалом для исследования служили образцы коры головного мозга людей (мужчин и женщин, 79–98 лет, $n=23$) из архива Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ». Для идентификации амилоидных бляшек применяли окраску Конго красным, альциановым синим, иммуногистохимическую (ИГХ) реакцию на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) и ИГХ реакцию с использованием конформационно-специфических ОС-антител против амилоидных фибрилл. Показано, что применение классической методики окраски амилоида Конго красным оказывается неэффективным для выявления амилоидных бляшек. Лишь в 6 из 23 проанализированных образцов было отмечено присутствие в коре единичных конгофильных скоплений. Количество бляшек в случае, взятом для количественного анализа, составило 5 шт./кв мм ткани. При окраске альциановым синим скопления амилоида также были обнаружены лишь в нескольких исследованных образцах, однако количество выявленных бляшек в этом случае составило 19 шт./кв мм ткани. Это свидетельствует о большей чувствительности метода окраски альциановым синим по сравнению с Конго красным. ИГХ реакция на GFAP, являющийся маркерным белком астроглии, позволила выявить во всех исследованных образцах скопления активированных астроцитов. Количество скоплений в случае, взятом для количественного анализа, составило 11 шт./кв мм ткани. Известно, что скопления астроцитов формируются в коре головного мозга вокруг амилоидных бляшек, поэтому ИГХ реакция на GFAP может быть использована для предварительного анализа образцов головного мозга на наличие/отсутствие амилоидных скоплений. ИГХ реакция с применением антител к конформационным эпитопам амилоидных фибрилл позволила идентифицировать амилоидные скопления во всех исследованных образцах. Количество иммунопозитивных бляшек в случае, взятом для количественного анализа, составило 47 шт./кв мм ткани. Это свидетельствует о высокой эффективности использованных конформационных антител для выявления амилоидных бляшек у человека.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации (МК-560.2020.7).

С.А. Денисова, С.В. Щенков

ЦИТОМОРФОЛОГИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ЦЕРКАРИЙ ТРЕМАТОД НА ПРИМЕРЕ *CERCARIA PARVICAUDATA* (DIGENEA, RENICOLIDAE)

Кафедра Зоологии беспозвоночных, Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

S.A. Denisova, S.V. Shchenkov

ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF THE CERCARIAL NERVOUS SYSTEM ON THE EXAMPLE OF *CERCARIA PARVICAUDATA* (DIGENEA, RENICOLIDAE)

Department of Invertebrate Zoology, Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

dersteppenwolf1608@gmail.com

Несмотря на широкую распространенность паразитических плоских червей, представители трематод (Digenea) являются наименее изученной группой с точки зрения цитоморфологии их нервной системы, особенно на промежуточных стадиях сложного жизненного цикла. Нами выполнено детальное описание ультраструктуры центральной нервной системы и нескольких наружных сенсорных рецепторов *Cercaria parvicaudata* Stunkard & Shaw, 1931 (Microphalloidea, Rencolidae). Нервная система *C. parvicaudata* состоит из двулопастного ганглия и парных дорсальных, вентральных и латеральных продольных нервных стволов, связанных поперечными комиссурами. Несмотря на отсутствие разных типов нейронов и их слабую морфологическую дифференцировку, на ультраструктурном уровне нервная система церкарии обладает признаками, характерными для относительно сложных нервных систем: наличие кортикальной зоны ганглия и многочисленных поляризованных синапсов пяти типов в нейропиле ганглия и в нервных стволах. Обнаружены глие-подобные оболочки вокруг ганглия и миелино-подобные оболочки аксонов нервных стволов. В теле личинки также были выявлены специализированные «поддерживающие» клеточные отростки, которые заполняют большую часть внеклеточного пространства, контактируя с разными системами органов. Предположительно, именно на основе этих отростков и формируются глие-подобные структуры (в тех случаях, когда отростки ассоциированы с элементами нервной системы). Цитоморфология «поддерживающих» клеток и отростков у *C. parvicaudata* сходна с таковой клеток экскреторных каналов этой личинки, а также с миоцитонами ее прикрепительных органов. Сравнительный анализ полученных и литературных [1, 2] данных позволяет предположить широкую распространенность глие-подобных клеток в нервной системе трематод, а также независимую дифференцировку этих структур как производных выделительной или мышечной систем.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00632.

Литература:

1. Dorsey C.H., Cousin C.E., Lewis F.A., Stirewalt M.A. Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. *Micron* 2002; 33: 279–323.
2. Biserova N.M., Gordeev I.I., Korneva J.V., Sal'nikova M.M. Structure of the Glial Cells in the Nervous System of Parasitic and Free-living Flatworms. *Biology Bulletin* 2010; 37(3): 277–287.

П.А. Егорова¹, И.Б. Безпрозванный^{1,2}

СТАБИЛИЗАЦИЯ КАЛЬЦИЕВОГО СТАТУСА КЛЕТКИ ПУРКИНЬЕ СПОСОБСТВУЕТ РЕГЕНЕРАЦИИ МОЗЖЕЧКА МЫШЕЙ-МОДЕЛЕЙ АТАКСИИ

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

² Юго-западный медицинский центр университета Техаса, Даллас, Техас, США

P.A. Egorova¹, I.B. Bezprozvanny^{1,2}

STABILIZATION OF PURKINJE CELLS CALCIUM STATUS IMPROVE THE RECOVERY OF THE CEREBELLUM IN A MOUSE MODEL OF ATAXIA

¹ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

² University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA

bio_polya@mail.ru

Спиноцеребеллярная атаксия 2-го типа (СЦА2) является неизлечимым наследственным заболеванием, вызываемым патологическим увеличением САG повторов в гене *ATXN2*, вследствие чего наблюдается трансляция мутантного белка атаксин-2 с цитотоксическими функциями, гибель нейронов мозжечка и нейродегенерация. Заболевание СЦА2 связано с прогрессирующим нарушением координации движений, потерей трудоспособности пациентов и инвалидностью. В случае пациентов СЦА2 в первую очередь наблюдается дегенерация клеток Пуркинью (КП) коры мозжечка. В предварительных экспериментах нашей лаборатории с использованием модельной системы липидного бислоя было показано, что мутантный атаксин-2, в отличие от атаксина-2 дикого типа, способен связываться с рецептором инозитол-3-фосфата на мембране ЭПР и способствовать его активации, что приводит к повышенному выходу ионов кальция из кальциевого пула в цитоплазму. Далее в подтверждение кальциевой гипотезы СЦА2 нами было показано значительное повышение выхода ионов кальция из ЭПР КП срезов мозжечка в случае стареющих СЦА2 мышей трансгенной линии SCA2-58Q по сравнению с мышами дикого типа (ДТ) того же возраста. Опустошение кальциевого пула в ЭПР предположительно приводит к увеличению нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК) в КП стареющих мышей-моделей атаксии. Недавно было показано, что важным регулятором уровня кальция в ЭПР являются белки семейства STIM. В частности, было выявлено, что белок STIM1 играет важную роль в контроле нДУВК в КП мозжечка мышей. Действительно, нами было показано, что уменьшение концентрации белка STIM1 приводит к восстановлению кальциевого статуса КП СЦА2 мышей до уровня КП ДТ мышей, при этом подавление экспрессии белка STIM1 никак не влияло на кальциевый статус КП ДТ мышей. Также было показано, что понижение нДУВК в КП СЦА2 мышей приводит к улучшению моторных функций подопытных животных. Таким образом, нами было продемонстрировано, что стабилизация концентрации внутриклеточных ионов кальция путем ограничения экспрессии белка-участника нДУВК, может являться одним из потенциальных способов терапевтического лечения СЦА2 и, возможно, других НДЗ со схожим генезисом.

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МК-1299.2019.4.

**А.С. Жигулин^{1,2}, М.Ю. Дронь¹, О.И. Барыгин¹
МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРОВАНИЯ АМРА РЕЦЕПТОРОВ ДИАМИДИНОВЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

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

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

A.S. Zhigulin^{1,2}, M.Y. Dron¹, O.I. Barygin¹

MECHANISMS OF AMPA RECEPTORS INHIBITION BY DIAMIDINE COMPOUNDS

¹ Sechenov institute of evolutionary physiology and biochemistry RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

arseniy.zhigulin@yandex.ru

Пентамидин и диминазин — это два ароматических диамидина, применяющихся в лечении африканского трипаносомоза. DAPI, также являясь диамидиновым соединением, используется в флуоресцентной микроскопии в качестве красителя для ДНК. Известно, что помимо основного действия эти соединения ингибируют NMDA рецепторы в микромолярных концентрациях. В данной работе впервые исследуется действие данных соединений на ещё один важный подтип ионотропных глутаматных рецепторов — АМРА рецепторы.

Эксперименты проводились на изолированных нейронах крыс линии Вистар методом фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка». Работа с кальций-проницаемыми АМРА рецепторами (CP-AMPA) осуществлялась на гигантских интернейронах стриатума, эксперименты на кальций-непроницаемых АМРА рецепторах (CI-AMPA) проводились на пирамидных клетках зоны CA1 гиппокампа. Изоляция нейронов из срезов осуществлялась методом вибродиссоциации. Основные эксперименты проводились при потенциале на мембране -80 мВ, рецепторы активировались с помощью каината (100 мкМ).

Все три диамидина концентрационно-зависимым образом ингибировали стационарный компонент токов, вызванных аппликацией агониста. В случае CP-AMPA величины IC_{50} составили 27 ± 5 , 46 ± 9 и 63 ± 11 мкМ для DAPI, пентамидина и диминазина, соответственно. При исследовании потенциал-зависимости оказалось, что в случае обоих типов рецепторов эффективность действия фиксированной концентрации пентамидина и DAPI имела максимум в районе потенциала -40 мВ, затем снижаясь при гиперполяризации. При анализе зависимости действия данных соединений от концентрации агониста обнаружилось, что для всех трёх веществ процент ингибирования рос с увеличением концентрации каината, что не только говорит об их неконкурирующем действии, но и означает усиление их действия в условиях большего числа открытых каналов. С этим хорошо согласуется тот факт, что в присутствии 100 мкМ позитивного аллостерического модулятора АМРА рецепторов — циклотиазида — уровень блокады пентамидином также возрастал. Таким образом, основным механизмом действия исследованных соединений на АМРА рецепторы является блокада открытых каналов с возможностью проваливания в цитоплазму.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект 17-74-10117).

Г.Ф. Закирьянова^{1,2}, А.М. Петров^{1,2}

**МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ
25-ГИДРОКСИХОЛЕСТЕРИНА В МОДУЛЯЦИИ
НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ**

¹ Институт нейронук, Казанский государственный
медицинский университет, Казань, Россия

² Лаборатория биофизики синаптических процессов,
Казанский институт биохимии и биофизики —
обособленное структурное подразделение ФИЦ
КазНЦ РАН, Казань, Россия

G.F. Zakirianova^{1,2}, A.M. Petrov^{1,2}

**THE MECHANISM
OF 25-HYDROXYCHOLESTEROL EFFECTS
ON NEUROMUSCULAR TRANSMISSION**

¹ Institute of Neuroscience, Kazan State Medical
University, Kazan, Russia

² Laboratory of Biophysics of Synaptic Processes,
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC
Kazan Scientific Center of RAS

farraguz12@gmail.com

25-гидроксихолестерин (25-ГХ) — один из главных окисленных форм холестерина, вырабатываемый при воспалении. Также 25-ГХ усиленно продуцируется при боковом амиотрофическом склерозе, приводящий к атрофии мышц с последующей респираторной недостаточностью и гибелью. 25-ГХ может являться одним из движущих факторов респираторной дисфункции. В дополнение, 25-ГХ выделяется макрофагами и тучными клетками, которые также обнаружены в скелетной мышце и могут контактировать с нервно-мышечным синапсом. Исходя из этого, мы сосредоточились на оценке эффекта 25-ГХ на нервно-мышечную передачу с использованием электрофизиологической и оптических методик. Результаты показали, что 25-ГХ (1 мкМ) снижает депрессию вызванных потенциалов концевой пластинки (показатель экзоцитоза) в ответ на 20 Гц в течение 3 мин. Однако, 25-ГХ не влиял на одиночные стимулы (0.05 Гц) и на частоту и амплитуду миниатюрных потенциалов концевой пластинки. Для оценки экзоцитоза использовали маркер FM1-43, связывающийся с пресинаптической мембраной и загружается в синаптические везикулы (СВ) в ходе эндоцитоза, последующая стимуляция приводит к потере красителя (экзоцитоз). Оказалось, что 25-ГХ усиливает потерю FM1-43. Сопоставление полученных результатов говорит о том, что 25-ГХ усиливает доставку СВ к сайтам экзоцитоза. В данном случае, 25-ГХ может усиливать экзоцитоз за счёт действия на мембрану или через рецептор-зависимый путь. Чтобы проверить эффект 25-ГХ на мембрану, использовались следующие красители. F2N12S — ратиометрический маркер, меняющий соотношение оранжевой к зелёной (RO/G) эмиссии при изменении распределения липидов в мембране за счёт аффинности к таким анионным липидам, как фосфатидилсерин и фосфатидилэтанолмин, которые при индукции апоптоза перестраиваются во внутренний слой мембраны. 22-NBD-холестерин — флуоресцентный аналог холестерина, встраивающийся в липид-неупорядоченную фазу, что позволяет оценивать текучесть мембраны. BODIPY™ FLC5-Ganglioside GM1 — аналог ганглиозида GM1, являющийся меткой липидных плотиков. Таким образом, эти красители позволяют оценить свойства мембран. 25-ГХ не изменял флуоресценцию ни одного красителя. Это указывает на то, что эффект 25-ГХ не связан с воздействием на липидную

мембрану. Поскольку известно, что 25-ГХ является лигандом для X рецепторов печени (LXR), мы применяли блокатор LXR. Оказалось, ингибирование LXR снимает ускоряющий эффект 25-ГХ. Далее мы применили блокаторы для Gi-белка, фосфолипазы C (ФЛС), протеинкиназы C (ПКС). Во всех трёх случаях так же снижается эффект 25-ГХ. Таким образом, можно сделать вывод, что 25-ГХ усиливает доставку СВ к сайтам экзоцитоза. Вероятно, механизм действия идёт по LXR — Gi-белок — ФЛС — ПКС-зависимому пути, а не через изменение свойств мембраны. Следовательно, 25-ГХ может рассматриваться как модулятор нервно-мышечной передачи.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00077 А.

М.В. Захарова, А.А. Коваленко, А.П. Шварц,
О.Е. Зубарева, А.В. Зайцев

**ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНОВ АСТРОЦИТАРНЫХ БЕЛКОВ
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ
ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ**

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

M.V. Zakharova, A.A. Kovalenko,
A.P. Schwarz, O.E. Zubareva, A.V. Zaitsev

**CHANGES IN EXPRESSION OF ASTROCYTIC
PROTEIN GENES IN THE EXPERIMENTAL
MODEL OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY**

Sechenov institute of evolutionary physiology
and biochemistry, Russian academy of sciences,
Saint-Petersburg, Russia

zaharova-masha@yandex.ru

До 30% больных эпилепсией страдают фармакорезистентными формами заболевания, что делает актуальным поиск новых методов лечения. В настоящее время обсуждается возможная роль глияльных клеток в эпилептизации мозга, связанная, в частности, с изменением экспрессии астроцитарных белков (GFAP, EAAT2 и др.). GFAP является маркером характерной для эпилепсии активации астроцитов. EAAT2 участвует в метаболизме возбуждающего нейромедиатора глутамата.

Цель исследования: изучение экспрессии генов *Gfap* и *Eaat2* в клетках дорзального и вентрального гиппокампа мозга крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии.

Использована литий-пилокарпиновая (Li-ПК) модель височной эпилепсии. Эпилептические изменения в данной модели развиваются в три этапа: введение ПК вызывает эпилептический статус, далее следует латентный период, в течение которого судороги не проявляются, через несколько недель (хронический период) у животных развиваются спонтанные рецидивирующие судороги.

Исследование выполнено на крысах самцах Вистар в возрасте 6–8 недель, которым вводили р-р LiCl и затем через 24 часа ПК. Контрольной группе крыс вводили физ. р-р и LiCl. Забор образцов мозга производили через 3, 7 дней после введения ПК (латентный период модели) и 2 месяца (хронический период). Определение мРНК *Gfap* и *Eaat2* производили методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Анализ полученных данных для вентрального гиппокампа выявил снижение экспрессии гена

Eaat2 на 3-е сутки после введения ПК, что позволяет предполагать повышенную активность глутаматергической системы. Также у экспериментальных крыс обнаружено увеличение продукции мРНК *Gfar*, которое носит волновой характер: различия между группами максимально выражены на 3 сутки, затем они несколько нивелируются на 7 сутки и снова возрастают на 60 день после введения ПК.

В дорзальном гиппокампе выявлено усиление экспрессии гена *Gfar* в латентный период модели: различия максимально выражены на 3 сутки после введения ПК, они сохраняются и на 7 сутки.

Таким образом, проведенное исследование показало изменение экспрессии генов *Eaat2* и *Gfar* в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии на различных этапах эпилептогенеза, что позволяет предполагать связь активации астроцитов с формированием спонтанных рецидивирующих судорог, характерных для Li-ПК модели эпилепсии и для височной эпилепсии человека.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-00-00408 КОМФИ.

А.А. Измайлов, М.Е. Соколов, В.А. Маркосян, Р.Р. Гарифулин, Ф.О. Фадеев, М.А. Давлеева, М.С. Кузнецов, А.Н. Лисюков, З.З. Сафиуллов

**КЛЕТЧНО-ОПОСРЕДОВАННАЯ
ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ С ПОМОЩЬЮ
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО
ЛЕЙКОКОНЦЕНТРАТА ДЛЯ
СТИМУЛИРОВАНИЯ НЕЙРОРЕГЕНЕРАЦИИ**

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

A.A. Izmailov, M.E. Sokolov, V.A. Markosyan, R.R. Garifulin, F.O. Fadeev, M.A. Davleeva, M.S. Kuznetsov, A.N. Lisuykov, Z.Z. Safiullova

**CELL-MEDIATED GENE THERAPY USING
GENE MODIFIED LEUCOCENTRATE FOR
STIMULATION OF NEUROREGENERATION**

Kazan state medical university, Kazan, Russia

gostev.andrei@gmail.com

В настоящее время в клинической практике нет эффективного способа преодоления последствий после ишемических инсультов, нейротравм и нейродегенеративных заболеваний. Одним из перспективных подходов для успешного решения данной проблемы является генная терапия, направленная на доставку рекомбинантных генов, кодирующих нейротрофические факторы. Ранее мы показали, что использование мононуклеарных клеток пуповинной крови человека (МКПК) в качестве клеточных носителей терапевтических генов, является перспективным способом клеточно-опосредованной генной терапии нейродегенеративных заболеваний [Сафиуллов и др., 2015], нейротравм [Izmailov и др., 2017] и ишемического инсульта головного мозга [Sokolov и др., 2018]. Наши результаты дают основание полагать, что интрацеребральное введение генетически модифицированных МКПК сдерживает гибель нейронов, способствует восстановлению экспрессии синаптических белков и положительно влияет на ремоделирование мозга.

Существенным недостатком применения МКПК для доставки терапевтических генов в организм пациента является ограниченная возможность в заготовке

пуповинной крови, относительно небольшое количество МКПК для однократной инфузии и невозможность повторных инфузий от одного и того же донора. Принимая во внимание данный факт, мы разработали новую технологию клеточно-опосредованной генной терапии, основанной на использовании лейкоконцентрата, полученного из периферической крови пациента, и рекомбинантных генов человека в контейнере для крови, без манипуляций *in vitro*. Впервые нами предлагается способ персонифицированной прецизионной генной терапии для стимулирования нейрорегенерации с помощью генетически модифицированного лейкоконцентрата (ГМЛ). Аутоинфузия ГМЛ, несущего терапевтические гены, обеспечит временную продукцию биологически активных молекул, сдерживающих гибель нейронов, поддерживающих рост аксонов и восстановление синаптических связей.

Таким образом, предложенный нами простой, эффективный и экономичный способ получения генно-клеточного препарата может быть одним из следующих прорывных направлений в генной терапии нейродегенеративных заболеваний.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 19-75-10030.

Литература:

1. Izmailov A.A. и др. Spinal Cord Molecular and Cellular Changes Induced by Adenoviral Vector- and Cell-Mediated Triple Gene Therapy after Severe Contusion. // *Front. Pharmacol.* 2017. Т. 8. С. 813.
2. Sokolov M.E. и др. Triple-Gene Therapy for Stroke: A Proof-of-Concept in Vivo Study in Rats // *Front. Pharmacol.* 2018. Т. 9. № February. С. 1–15.
3. Сафиуллов З.З. и др. Адресная миграция и выживание генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека после трансплантации G93A мышам с моделью бокового амиотрофического склероза // *Гены и клетки.* 2015. Т. X. № 4. С. 1–4.

А.Р. Ильина^{1,2}, Н.А. Красковская², Н.С. Линькова^{1,3}

АНАЛИЗ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ДЕНДРИТНЫХ ШИПИКОВ НЕЙРОНОВ CA1 ОБЛАСТИ ГИППОКАМПА В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА 5XFAD-M

¹ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия
² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
³ Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА», Москва, Россия

A.R. Ilina^{1,2}, N.A. Kraskovskaya², N.S. Linkova^{1,3}

ANALYSIS OF HIPPOCAMPAL CA1 NEURONS DENDRITIC SPINES PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN THE 5XFAD-M MOUSE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

¹ Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Saint Petersburg, Russia
² Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia
³ Academy of postgraduate education under FSBU FSCC of FMBA of Russia, Moscow, Russia

juin96@mail.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) — самое распространенное нейродегенеративное заболевание и основная причина деменции у лиц пожилого и старческого возраста. На ранних этапах БА с ухудшением когнитивных способностей наиболее тесно коррелирует снижение количества синапсов нейронов гиппокампа [5]. Функциональные изменения в синапсе проявляются в изменении морфологии и количества постсинаптических структур — дендритных шипиков [1]. Сейчас визуализация морфологии нейронов осложнена необходимостью окрашивания препаратов мозга или инъектирования дорогостоящих вирусов *in vivo* [4]. Цель работы — создание линии мышей для изучения морфологии нейронов при БА без применения указанных методик.

Для визуализации морфологии нейронов при БА был проведен кросс-бридинг мышей линии 5xFAD и линии M. Линия мышей 5xFAD содержит наследственные мутации в белках, ассоциированных с патогенезом БА [3]. У мышей линии M в пирамидных нейронах гиппокампа экспрессируется зеленый флуоресцентный белок, не влияющий на их морфологию [2].

На фиксированных срезах мозга мышей кросс-линии 5xFAD-M начиная с возраста 4-х месяцев было выявлено снижение плотности шипиков апикальных дендритов пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа по сравнению с контролем (линия M). Полученный результат свидетельствует о том, что линия мышей 5xFAD-M может быть использована для анализа патоморфологических изменений нейронов гиппокампа при развитии нейропатологии, а также для оценки эффективности потенци-

альных терапевтических агентов для лечения БА. Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-15-00184 (Безпрозванный И.Б.).

Литература:

1. Bourne J.N., Harris K.M. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci* 2008; 31: 47–67.
2. Feng G., Mellor R. H., Bernstein M., et al. Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. *Neuron* 2000; 28(1): 41–51.
3. Oakley H., Cole S.L., Logan S., et al. Intraneuronal β -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci* 2006; 26(40): 10129–40.
4. Smith C.A., Chauhan B.C. In vivo imaging of adeno-associated viral vector labelled retinal ganglion cells. *Sci Rep* 2018; 8(1).
5. Terry R.D., Masliah E., Salmon D.P., et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991; 30(4): 572–80.

Е.К. Карсунцева^{1,2}, А.Д. Воронова¹,
 О.В. Степанова¹, М.П. Валихов¹, А.В. Чадин¹,
 А.С. Семкина¹, Г.А. Фурса^{1,2}, П.А. Мельников¹,
 И.В. Решетов³, В.П. Чехонин¹

ВЫЖИВАЕМОСТЬ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ КИСТАХ СПИННОГО МОЗГА

¹ Отдел фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ ФМИЦПН им. В.П. Сербского Минздрава РФ, Москва, Россия
² Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
³ Университетская клиническая больница № 1 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

E.K. Karsuntseva^{1,2}, A.D. Voronova¹,
 O.V. Stepanova¹, M.P. Valikhov¹, A.V. Chadin¹,
 A.S. Semkina¹, G.A. Fursa^{1,2}, P.A. Melnikov¹,
 I.V. Reshetov³, V.P. Chekhonin¹

SURVIVAL OF TRANSPLANTED CELLS OF HUMAN OLFACTORY MUCOSA IN POSTTRAUMATIC CYSTS OF SPINAL CORD

¹ The Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Moscow, Russia
² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

katya.karsunceva@gmail.com

Клеточная терапия травм спинного мозга является перспективным направлением в области лечения травм спинного мозга, так как существующие хирургические и медикаментозные подходы малоэффективны. В многочисленных экспериментах и ряде доклинических исследований были показаны положительные эффекты на регенерацию спинного мозга при использовании клеток обонятельной выстилки. В нашем отделе впервые при трансплантации обкладочных и нейральных стволовых/прогениторных клеток (НСПК) обонятельной выстилки человека в посттравматические кисты спинного мозга наблюдалось восстановление двигательной активности задних конечностей крыс. Важнейшей проблемой

клеточной трансплантологии остается выживаемость клеток в органах-мишенях.

Целью данной работы было изучить выживаемость трансплантированных обкладочных клеток и НСПК обонятельной выстилки человека при посттравматических кистах спинного мозга.

В данной работе обкладочные клетки были получены из собственной пластинки обонятельной выстилки по разработанным нами протоколам, НСПК были получены в составе нейросфер. Образцы ткани обонятельной выстилки человека были предоставлены УКБ № 1. Исследование одобрено локальным этическим комитета РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Моделирование посттравматических кист спинного мозга проводили на уровне Th3-Th4 на половозрелых самках крыс линии Вистар весом от 200 грамм. Все манипуляции выполняли при обезболивании животных. Визуализацию кист проводили методом МРТ. Для изучения выживаемости клеток после трансплантации был использован прижизненный мембранный краситель PKH26. Меченные обкладочные клетки (1,5 млн клеток) и НСПК (200 тыс клеток) были трансплантированы животным в посттравматические кисты.

Было показано, что при трансплантации обкладочных клеток и НСПК в посттравматические кисты клетки выживают в течение всех 4 недель, кроме того, наблюдалась их миграция в близлежащие ткани. Известно, что трансплантированные обкладочные клетки и НСПК способны секретировать нейротрофические факторы, которые оказывают влияние на ремиелинизацию нервных волокон в области повреждения, способствуя восстановлению проводимости нервного импульса, а также на выживаемость нейронов, прорастание их аксональных отростков, пластичность и регенерацию спинного мозга в целом. Кроме того, трансплантированные НСПК могут дифференцироваться в зрелые нейроны и формировать синаптические связи с клетками реципиента, восстанавливая нейронные сети. Таким образом, обонятельная выстилка является доступным источником для получения сразу двух типов тканеспецифичных нейральных клеток, которые способны активно участвовать в регенерации спинного мозга. Долговременная выживаемость данных клеток после трансплантации, показанная в нашей работе, является важным фактором для успешной клеточной терапии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-15-01133.

Е.А. Козубенко¹, Н.А. Сидорова²,
П.А. Зыкин², Л.А. Ткаченко¹

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СЛОЙ-СПЕЦИФИЧНЫХ МАРКЕРОВ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ВО ВТОРОЙ ПОЛОВИНЕ ГЕСТАЦИИ

¹ Санкт-Петербургский Государственный университет, Россия

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Россия

E.A. Kozubenko¹, N.A. Sidorova²,
P.A. Zykin², L.A. Tkachenko¹

IMMUNOHISTOCHEMICAL DISTRIBUTION OF LAYER-SPECIFIC MARKERS IN THE CORTEX OF THE HUMAN BRAIN IN THE SECOND HALF OF THE GESTATION

¹ Saint-Petersburg State University, Russia

² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Russia

st060565@student.spbu.ru

Исследования социально значимых заболеваний, таких как аутизм, шизофрения, височная эпилепсия и др., указывают на то, что их причинами могут являться нарушения пренатального развития неокортекса. Последовательное изучение особенностей кортикогенеза человека способствует выявлению критических этапов развития популяций нейронов коры и связей, которые они формируют, что актуально для разработки предиктивной диагностики неврологических отклонений пренатального генеза.

Работа направлена на изучение особенностей цитоархитектоники и развития слой-специфичных популяций нейронов неокортекса височной и островковой областей коры мозга человека во второй половине гестации.

Исследование было выполнено на серии парафинowych срезов височной и островковой долей конечного мозга человека 21 и 25 недель гестации (по 2 полушария). Архивный материал был предоставлен СПбГПМУ, исследование одобрено разрешением этического комитета (IRB 00003875). Иммуногистохимическое окрашивание проводили с использованием ряда слой-специфичных маркеров: SATB2 — маркер каллозальных пирамидных нейронов (слои eII, eIV), STIP2 — маркер кортико-спинальных пирамидных нейронов (слои eV, eVI) и FOXP1 — маркер пирамидных клеток нижнего комплекса слоев. Для оценки цитоархитектоники смежные срезы окрашивали по методу Ниссля.

На 20–21 неделе гестации FOXP1+ и STIP2+ нейроны локализованы в нижнем комплексе слоев всех исследованных областей неокортекса. FOXP1+ клетки имеют равномерный, широкий паттерн распределения, STIP2+ клетки разделяются на две субпопуляции: eIV+eV и eVI. В ростральных отделах островковой и верхней височной областей SATB2+ выявляются широкой полосой в слоях eII-eV. К 25 неделе гестации FOXP1+, STIP2+ и SATB2+ клетки сконцентрированы в слоях eIV+eV. Отчетливо выявляется субпопуляция клеток, которая характеризуется колокализацией всех маркеров и формирует плотный слой eV в островковой и височной областях коры. Важно отметить, что на этом сроке региональная специфичность распределения отдельных субпопуляций нейронов становится отчетливой: в средней височной области выделяется популяция FOXP1+ клеток в слое eVI,

в каудальной части верхней височной области появляются SATB2⁺ клетки в слое eII, исчезает субпопуляция CTIP2⁺ клеток в слое eVI.

Таким образом, применение иммуногистохимического маркирования позволило выделить как специфичные субпопуляции нейронов внутри корковой пластинки неокортекса, так и оценить принадлежность маркированных нейронов к определенному слою развивающейся коры. Тогда как цитоархитектоническое исследование срезов, окрашенных по Нисслю, показало, что на исследуемых сроках кора слабо стратифицирована.

«Исследование выполнено с использованием оборудования Научного парка СПбГУ, проект 109-11628.»

Е.А. Колос

РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК-САТЕЛЛИТОВ СПИНОМОЗГОВОГО ГАНГЛИЯ КРЫСЫ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

E.A. Kolos

REACTIVE CHANGES IN SATELLITE GLIAL CELLS OF THE RAT DRG

Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine"; Saint-Petersburg, Russia

koloselena1984@yandex.ru

Клетки-сателлиты (КС) спинномозгового ганглия (СМГ) -глиальные клетки, образующие непрерывный слой вокруг сенсорных нейронов. В ответ на нарушение гомеостаза нервной системы КС способны активироваться, что проявляется изменением ионного состава перинейронального пространства, увеличением количества щелевых контактов между КС, активацией синтеза нейротрофинов, цитокинов и других веществ [1]. Показателем данного процесса считается увеличение экспрессии глиоцитами СМГ белка промежуточных филаментов — GFAP [2].

Цель работы — исследование реактивных изменений клеток-сателлитов СМГ при системном воспалении и на поздних этапах постнатального онтогенеза с использованием иммуногистохимического выявления GFAP.

В работе использовали крыс Вистар в возрасте 4 и 18 мес (n=20). Кроме того, группе молодых животных внутрибрюшинно был введен раствор липополисахарида (ЛПС) *E. coli* в дозе 2 мг/кг (n=5). Животным группы контроля (n=5) вводили физиологический раствор в том же объеме. Исследование СМГ (CIII-CV) проводили после фиксации материала в цинк-этанол-формальдегиде. Иммуногистохимическое выявление GFAP осуществляли на парафиновых срезах с использованием кроличьих поликлональных антител (Agilent, США) и флуоресцентной микроскопии.

Установлено, что у стареющих животных количество активированных GFAP-иммунопозитивных КС существенно возрастает по сравнению с молодыми крысами: приблизительно в 4 раза (p<0,01). Оказалось, что аналогичная реакция КС наблюдается при системном воспалении, возникающем после введения ЛПС. Полученные данные свидетельствуют о сходстве механизмов реактивных глиальных изменений при старении и системном

воспалении и могут служить одним из подтверждений теории воспалительного старения.

Литература:

1. Pannese E. Biology and pathology of perineuronal satellite cells in sensory ganglia. Springer International Publishing. 2018. 83p.
2. Feldman-Goriachnik R., Belzer V., Hanani M.. Systemic inflammation activates satellite glial cells in the mouse nodose ganglion and alters their functions. *Glia*. 2015; 63 (11): 2121–2132.

К.С. Королёва, Е.В. Ермакова, Г.Ф. Ситдикова

ВЛИЯНИЕ ДОНОРА СЕРОВОДОРОДА НА УРОВЕНЬ ДЕГРАДУЛЯЦИИ МЕНИНГЕАЛЬНЫХ ТУЧНЫХ КЛЕТОК КРЫС

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

K.S. Koroleva, E.V. Ermakova, G.F. Sitdikova

THE EFFECT OF A DONOR OF HYDROGEN SULFIDE ON THE LEVEL OF DEGRANULATION OF RAT MENINGEAL MAST CELLS

Kazan Federal University, Kazan, Russia

kseniakoroleva@outlook.com

Известно, что газообразный медиатор, сероводород, участвует в процессах ноцицепции. В представленном исследовании рассматривается роль сероводорода в патогенезе первичных головных болей, в частности мигрени. Согласно пуринергической теории мигрени, АТФ обладает ноцицептивным действием, посредством активации P2X рецепторов нервных окончаний тройничного нерва, а также на мембране менингеальных тучных клеток, вызывая их дегрануляцию. Было обнаружено, что P2X рецепторы ко-экспрессируются с ферментом синтеза сероводорода — цистационин-β-синтаза, что указывает на возможное взаимодействие между сигнальными путями. Целью исследования было оценить влияние H₂S на АТФ-вызванную дегрануляцию тучных клеток в менингеальных оболочках мозга крысы.

Исследование дегрануляции тучных клеток осуществлялось с помощью гистологического метода окрашивания твердой оболочки мозга крыс (P35-40) Толуидиновым Синим в контроле и после инкубации в растворе, содержащем NaHS (100мкМ), АТФ (100мкМ), NaHS+АТФ, VzATP (30мкМ), NaHS+VzATP

АТФ вызывал достоверное увеличение числа дегранулированных клеток по сравнению с контрольной группой. Для исследования эффектов H₂S на состояние тучных клеток, интактные оболочки мозга инкубировали в растворе, содержащем NaHS в течение 30 мин. Инкубация оболочек в доноре сероводорода не приводила к изменению морфологии тучных клеток, и количество дегранулированных клеток не превышало контрольные значения. Предварительная инкубация в NaHS в течение 10 мин с последующим добавлением в инкубируемый раствор АТФ на 20 мин, также не повышала уровень дегрануляции тучных клеток. Таким образом, донор H₂S предотвращал дегрануляцию тучных клеток при действии АТФ. Известно, что дегрануляция тучных клеток при действии АТФ опосредуется активацией P2X₇-рецепторов, которые участвуют в транспорте АТФ через мембрану и в модуляции активности паннексин-1 каналов. Поэтому в последующих экспериментах мы проанализировали способность агониста P2X₇-рецепторов

(BzATP) активировать тучные клетки и влияние донора NaHS на его эффект. Оказалось, что BzATP приводил к увеличению числа дегранулированных клеток в 2 раза. Предварительная инкубация в NaHS в течение 10 мин предотвратила P2X₇ опосредованную дегрануляцию тучных клеток оболочки головного мозга крысы и количество дегранулированных тучных клеток было сопоставимо с контрольными значениями. Таким образом, донор сероводорода предотвращает дегрануляцию тучных клеток при действии АТФ, что, по-видимому, опосредовано снижением активности P2X₇-рецепторов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ № 18-315-00256 и ГФЕН Китая в рамках научного проекта № 20-515-53005.

Е.Д. Курмашова, Э.Д. Гатаулина

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА ВОЗРАСТНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ НМДА- РЕЦЕПТОРОВ КРЫС

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань

E.D. Kurmashova, E.D. Gataulina

INFLUENCE OF PRENATAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA ON AGE-CHANGE NMDA RECEPTORS RAT

Kazan (Volga) Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan

kurmashovaed@gmail.com

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) является прогностическим фактором риска инсульта, скрининга генетических нарушений метаболизма метионина, а также в качестве выявления дефицита витаминов группы В. Одной из основных мишеней гомоцистеина в ЦНС являются НМДА рецепторы.

Ионотропные глутаматные рецепторы, активируемые N-метил-D-аспартатом (НМДА-рецепторы), играют важную роль в процессе развития и функционирования ЦНС. Участки связывания глутамата находятся на NR2-субъединице рецептора, а NR1-субъединица содержит участок связывания глицина, являющийся коагонистом глутамата. Так, глутамат и НМДА вызывают кратковременную активацию киназного каскада, в то время как ГЦ приводит к долговременной активации, ведущей к нарушению нормальных путей передачи сигнала и индукции клеточной смерти [1].

Целью исследования стало изучение влияния пренатальной ГГЦ на НМДА-опосредованные токи в пирамидальных нейронах гиппокампа крыс в ранний постнатальный период. Эксперименты проводились на горизонтальных срезах гиппокампа крысят (P3–P7, P8-10, где P0-день рождения). Опосредованные токи пирамидальных нейронов регистрировали методом пэтч-кламп, в режиме «целая клетка» с фиксацией потенциала на -70 мВ для регистрации АМПА ответов в и +40 мВ- НМДА ответов для дальнейшего анализа соотношения. Эти рецепторы имеют различную кинетику (АМПА, 2–7 мс; НМДА, 50–100 мс). НМДА рецепторы важны для Ca²⁺-зависимой пластичности и обучения, отношение НМДА рецепторов к АМПА рецепторным опосредованным токам в возбуждающих синапсах являются ключевым фактором, определяющим как краткосрочную

интеграцию синаптических входов пирамидных нейронов гиппокампа и их долгосрочные модификация [2]. В условиях пренатальной ГГЦ на 5–7 сутки наблюдается резкое снижение соотношения АМПА и НМДА ответов с 0,48 ± 0,07 в контроле до 0,21 ± 0,06 (n=9) (p>0.05). Аналогичная тенденция наблюдается на вторую неделю постнатального развития (P8-10) в контрольных условиях соотношение составило 0,89 ± 0,1, в то время как в условиях пренатальной ГГЦ 0,39 ± 0,09 (n=16) (p>0.05).

Также была проанализирована амплитуда вызванных синаптических ответов. Полученные данные показали явное увеличение амплитуды НМДА ответов в условиях пренатальной ГГЦ. При фиксации потенциала клетки на +40 мВ наблюдалось достоверное увеличение амплитуд как в первые 3–4 дня постнатального развития (контроль- 26,7 ± 6 пА), так и в 5–7 дней (ГГЦ-37 ± 6 пА) (p>0.05).

Таким образом, в данной работе было показано, что хроническое воздействие ГЦ приводит к увеличению активации НМДА рецепторов, что может быть причиной гипервозбудимости нейрональных сетей, и как следствие приводит к развитию эпилепсии.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-015-00423 А.

Литература:

1. Болдырев А.А. // БИОХИМИЯ 2012, том 77, вып. 2, с. 160–168
2. Bliss, T. V. P., & Collingridge, G. L. // Nature 1993, 361(6407), 31–39.

В.Ф. Лазарев, Е.А. Дутышева, Е.Р. Михайлова, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

V.L. Lazarev, E.A. Dutysheva, E.R. Mikhaylova, I.V. Guzhova, B.A. Margulis

MOLECULAR TARGETS FOR COMBINED THERAPY OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

vl.lazarev@gmail.com

Наиболее распространенной причиной появления сенильной деменции является болезнь Альцгеймера. В ее основе лежит огромное количество различных механизмов. Тем не менее, среди них можно выделить механизмы, индуцирующие окислительный стресс, апоптоз, формирование токсичных агрегатов с участием нормальных, необходимых для жизнедеятельности клетки белков. Мы предложили новый подход для терапии пациентов с деменцией. Этот подход подразумевает комбинированное применение лекарств, нацеленных на блокирование нескольких параллельно протекающих патогенных процессов. В рамках предложенной концепции мы апробировали совместную терапию с помощью 2 групп препаратов — вещества, индуцирующие синтез белков шаперонов, и соответственно, имеющих анти-апоптозное и противовоспалительное действие, и препаратов блокирующие формирование цитотоксичных белковых комплексов.

Наш коллектив провел скрининг коллекции химических соединений и обнаружил новый индуктор синтеза

белка Hsp70 — PQ29. Было установлено, что механизм действия PQ29 связан с активацией транскрипционного фактора Hsf1. Одним из белков, принимающих участие в формировании агрегатов при нейродегенеративных заболеваниях является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД). Нами был апробирован ингибитор агрегации белка ГАФД, соединение RX624, на трансгенных мышах с болезнью Альцгеймера (линия 5xHAD). Мы доказали, что терапия с помощью RX624 приводит к снижению количества агрегатов ГАФД и бета-амилоида в гиппокампах трансгенных мышей линии 5xHAD.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-34-80051

**А.В. Литвинова, А.А. Бутина, Е.Н. Верзилина,
Д.В. Трофименкова, Ю.А. Власова**

ЭФФЕКТ ПАРАЦЕТАМОЛА НА КЛЕТКИ PC12 ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

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

**A.V. Litvinova, A.A. Butina, E.N. Verzilina,
D.V. Trofimenkova, Y.A. Vlasova**

PARACETAMOL EFFECT ON PC12 CELLS DURING THE TOXIC IMPACT OF A BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

butina.anastasia22@bk.ru

В последние годы проводятся многочисленные исследования, изучающие связь между нарушениями нервно-психического развития детей и приемом парацетамола их матерями во время беременности. Однако число работ, изучающих токсическое действия парацетамола на центральную нервную систему, невелико.

Целью нашего исследования было изучение действия 1 mM парацетамола на клетки нейрональной линии PC12 при действии бактериального липополисахарида серотипа O111 B4.

Для определения жизнеспособности клеток использовался МТТ-метод.

Клетки сеяли в 96-луночный планшет в концентрации 5×10^4 клеток в лунке за 24 часа до эксперимента, инкубировали с 1 мг/мл парацетамолом (24 часа), затем с 0,25 мг/мл ЛПС (24 часа). Добавляли 0,5 мг/мл реагента МТТ за 2 часа до окончания инкубации. Клетки лизировали с 20% SDS в растворе 50% диметилформамида в 0,05 н HCl. Содержание окрашенного продукта измеряли при 570 нм на микропланшетном ридере. Результаты выражали в процентах от контроля.

Данные представлены как $M \pm S.E.M$. Статистическую достоверность определяли на основании однофакторного дисперсионного анализа с использованием Tukey's post hoc теста для множественных сравнений. При сравнении двух групп данных применяли t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Нами было показано, что при инкубации 0,5 мг/мл липополисахарид снижает выживаемость клеток PC12 до $65,1 \pm 4,7\%$ по сравнению с контролем (100%). Преинкубация с парацетамолом предотвращает гибель

клеток (доля выживших составляет $87,4 \pm 4,1\%$). Таким образом показано, что в высоких концентрациях (1 mM) оказывает защитное действие на клетки линии PC12, снижая цитотоксическое действие липополисахарида.

Работа выполнена на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Литература:

1. Acetaminophen use in pregnancy and neurodevelopment: attention function and autism spectrum symptoms / C. Avella-Garcia, J. Julvez, J. Fortuny [et al.]. - Текст: непосредственный // Int. J. of Epidemiology. - 2016. - Vol. 45. - No. 6. - P. 1987-1996.
2. Schultz S., DeSilva M., Gu T., Qiang M., Whang K. Effects of the Analgesic Acetaminophen (Paracetamol) and its para-Aminophenol Metabolite on Viability of Mouse-Cultured Cortical Neurons. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2011. Vol. 110. P. 141-144.

**М.М. Логинова, Р.С. Ярков, Т.А. Мищенко,
М.В. Ведунова, Е.В. Митрошина**

РОЛЬ КИНАЗ IKKB, SRC И RIPK В АДАПТАЦИИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК К ВОЗДЕЙСТВИЮ ГИПОКСИИ И ГЛЮКЗОЙ ДЕПРИВАЦИИ IN VITRO

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

**M.M. Loginova, R.S. Yarkov, T.A. Mishchenko,
M.V. Vedunova, E.V. Mitroshina**

THE ROLE OF IKKB, SRC AND RIPK KINASES IN THE ADAPTATION OF NERVE CELLS TO HYPOXIA AND GLUCOSE DEPRIVATION IN VITRO

Lobachevsky University, Nizhny Novgorod, Russia

pandaagron@ya.ru

Киназы — большая группа ферментов, регулирующая протекание многочисленных метаболических процессов в клетке, таких как клеточная пролиферация, дифференцировка, регуляция генов выживания. Они являются возможными терапевтическими мишенями при действии различных повреждающих факторов, например, ишемии, однако в настоящее время неизвестно, какую именно роль в адаптации нервных клеток к повреждающим воздействиям играют многие киназы. Нами были исследованы нейропротекторные свойства киназ IKKb, SRC и RIPK при моделировании гипоксии и глюкозной депривации как основных факторов ишемии.

Объектом исследования являлись первичные культуры коры клеток головного мозга, полученные от эмбрионов мышей линии C57Bl/6 (E18). Моделирование глюкозной депривации (ГД) и гипоксии осуществлялось на 14 сутки развития культур. Блокаторы соответствующих киназ (1 мкМ) добавляли при моделировании повреждающих факторов. Показано, что блокада киназ IKKb, SRC и RIPK в условиях нормы не оказывала влияния на жизнеспособность клеток. Исследованы особенности воздействия блокаторов на жизнеспособность нервных клеток in vitro при моделировании различных факторов ишемии. Блокада киназ IKKb и SRC повышала жизнеспособность при действии обоих факторов (Интактная культура — $94,34 \pm 1,32\%$, Гипоксия — $77,94 \pm 1,75\%$, Гипоксия + ингибитор IKKb — $94,83 \pm 1,39\%$, Гипоксия + ингибитор SRC — $87,03 \pm 1,02\%$, ГД — $78,79 \pm 0,99\%$, ГД +

ингибитор IKK β — 90,32 \pm 1,2%, ГД+ ингибитор SRC — 88,33 \pm 1,21%). Блокада киназы RIP при ГД сохраняла жизнеспособность клеток (86,83 \pm 1,49%), а при гипоксии, напротив, снижала (66,09 \pm 4,61%).

На втором этапе мы исследовали функциональную кальциевую активность первичных культур клеток гиппокампа с помощью кальциевого имиджинга с применением кальций-чувствительного красителя Oregon Green 488. При моделировании гипоксии и глюкозной депривации происходило достоверное снижение числа клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность (Интактная культура — 60,43 \pm 1,15%, Гипоксия — 35,91 \pm 1,05%, ГД — 36,98 \pm 4,64%). Блокада киназы SRC повышала процент клеток, проявляющих функциональную кальциевую активность только в случае моделирования глюкозной депривации (46,18 \pm 2,96%). Ингибирование IKK β снизило число клеток, проявляющих активность при глюкозной депривации (21,54 \pm 4,58%), но не оказало влияния при моделировании гипоксии. Следует отметить, что блокада RIPK сохраняла функциональную кальциевую активность нервных клеток при действии обоих стресс-факторов (при гипоксии — 57,05 \pm 11,74%, при ГД — 74,81 \pm 5,15%).

Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ (гранты № 18-015-00391, 18-315-20003) и гранта Президента РФ МК-1485.2019.4.

**Д.С. Матюшкина, И.О. Бутенко, Г.Ю. Фисунов,
Д.В. Евсютина, В.М. Говорун**
**РОЛЬ МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ
В РАЗВИТИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ**

ФГБУ ФНКЦ Физико-Химической Медицины ФМБА
России, Москва, Россия

**D.S. Matyushkina, I.O. Butenko, G.Yu. Fisunov,
D.V. Evsyutina, V.M. Govorun**
**THE ROLE OF MYCOPLASMA
INFECTION IN THE DEVELOPMENT
OF NEURODEGENERATIVE DISEASES**

FRCC PCM, Moscow, Russia

d.matyushkina@gmail.com

На данный момент известно, что многочисленные неврологические заболевания ассоциированы с инфекцией, патологические эффекты которой уже давно были хорошо задокументированы. Однако остается неясным, какова роль инфекции как причины или фактора риска развития хронических нейродегенеративных заболеваний. Так как мозг богат липидами, содержащими полиненасыщенные жирные кислоты, перекисное окисление липидов (ПОЛ) является характерным типом окислительного повреждения. ПОЛ считается ранним событием в патогенезе болезни Альцгеймера (БА). Дисрегуляция железа, которая может усиливать образование активных форм кислорода, также наблюдается в мозге при БА. Интересно, что ПОЛ и дисрегуляция железа идентифицируют новый механизм гибели клеток, называемый ферроптозом. Но важнее выявить фактор, запускающий развитие окислительных процессов и ферроптоза. И ключевую роль в этом может играть бактериальная инфекция, вызванная микоплазмой. Большинство представителей данного класса ведут паразитический образ жизни внутри клетки-хозяина, получая таким образом

все необходимые для существования вещества, поскольку сами не способны к их синтезу в связи со значительной редуциацией метаболизма. Находясь внутри эукариотической клетки, микоплазмы оказываются защищенными от действия иммунной системы хозяина и действия антибиотиков, в связи с чем они способны длительное время персистировать в организме, приводя к развитию хронических заболеваний. На модели взаимодействия эукариотических клеток линии HD3 и *Mycoplasma gallisepticum* мы показали, что происходит избыточная секреция перекиси водорода, которая является ключевой молекулой для запуска ПОЛ — предвестника ферроптоза. Кроме того, проведенное измерение уровня глутатиона показало его снижение в инфицированных клетках, что свидетельствует о нарушении восстановительных ресурсов клетки. О ферроптозном пути гибели эукариотических клеток при взаимодействии с микоплазмой свидетельствуют и полученные протеомные данные, выполнение с помощью методов shotgun и SILAC. Таким образом, выявление инфекционных агентов, приводящих к развитию ферроптоза, понимание механизмов их работы позволит снизить риск развития нейродегенеративных заболеваний и продвинуться в методах лечения уже развившихся нарушений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-15-00427.

А.В. Михель^{1,2}, А.Д. Щербичская^{1,2}

**ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ
ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ
НА ФОРМИРОВАНИЕ НЕРВНОЙ ТКАНИ КРЫС**

¹ Научно-исследовательский институт акушерства,
гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта,
Санкт-Петербург, Россия

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

A.V. Mikhel^{1,2}, A.D. Shcherbitskaia^{1,2}

**THE EFFECT OF PRENATAL
HYPERHOMOCYSTEINEMIA ON THE
FORMATION OF RAT NERVOUS TISSUE**

¹ Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and
Reproductology, Saint-Petersburg, Russia

² Sechenov Institute of Evolutionary Physiology
and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
Saint-Petersburg, Russia

anastasia.michel39@gmail.com

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) матери является одной из причин фетоплацентарной недостаточности и хронической внутриутробной гипоксии плода, что может приводить к нарушению когнитивных функций потомства при постнатальном развитии [1]. Поэтому изучение влияния пренатальной ГГЦ на формирование нервной ткани потомства становится важной задачей для последующей разработки мер, направленных на устранение негативного влияния гомотеина. В данной работе беременные самки крыс линии Вистар были разделены на две группы: экспериментальная группа — самки, которым с 4-го дня беременности до родоразрешения перорально вводили раствор метионина; контрольная группа — самки, которым вводили воду. На 20-й день беременности были извлечены плоды и произведен анализ содержания нейротрофинов в их мозге с помощью иммуноблоттинга. Анализ клеточного состава коры мозга

крысят на P5 и P20 был проведен по методу Ниссля, а также с помощью специфических антител Iba1, GFAP, NeuN. С использованием иммуноферментного анализа было проведено исследование уровня провоспалительных цитокинов в данной структуре. Нами показано, что в мозге плодов крыс с пренатальной ГГЦ наблюдалось повышение уровня про-форм BDNF и NGF, которые взаимодействуя со специфическими рецепторами способны приводить к снижению пролиферации нейронов и усилению процессов апоптоза [2]. При этом нами было обнаружено снижение количества нейронов в префронтальной коре мозга крыс на P5 и P20. Нейротоксические эффекты пренатальной ГГЦ также проявлялись в увеличении количества глиальных клеток в коре мозга крысят, что может говорить о развитии нейровоспаления [3]. Подтверждением данного предположения является специфическое повышение уровня IL-1 β в данной структуре. Таким образом, пренатальная ГГЦ приводит к нарушению формирования нервной ткани, которое наблюдается уже во внутриутробном периоде и может являться причиной развития когнитивных дисфункций при постнатальном развитии потомства.

Поддержано средствами государственного бюджета по госзаданию (AAAA-A19-119021290116-1, AAAA-A18-118012290373-7) и грантом РФФИ 18-015-00099, 20-015-00388.

Литература:

1. Щербицкая А., Милютина Ю., Залозная И. и др. Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на формирование памяти и содержание биогенных аминов в гиппокампе самок крыс. *Нейрохимия* 2017; 34(4): 296–302.
2. Sasi M., Vignoli B., Canossa M. et al. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Arch.* 2017; 469(5–6): 593–610.
3. Yang Q., Zhou J. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia* 2019; 67(6): 1017–1035.

А.Н. Нагуманова¹, А.Э. Вылегжанина¹,
И.Г. Шалагинова¹, Д.А.-А. Хлебаева²

ПОСТСТРЕССОРНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО СОСТАВА КРОВИ У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ВОЗБУДИМОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

¹ Балтийский федеральный университет имени
Иммануила Канта, Калининград, Россия

² Институт физиологии имени И.П. Павлова
Российской Академии наук, Санкт-Петербург,
Россия

A.N. Nagumanova¹, A.E. Vylegzhanina¹,
I.G. Shalaginova¹, D.A.-A. Khlebaeva²

POST-STRESS CHANGES IN THE LEUKOCYTE COMPOSITION OF BLOOD IN RATS WITH DIFFERENT LEVELS OF EXCITABILITY OF THE NERVOUS SYSTEM

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad,
Russia

² Pavlov Institute of Physiology of the RAS, Saint
Petersburg, Russia

nagumanova_anastasia@mail.ru

Имеются убедительные доказательства наличия системного воспаления как у пациентов с постстрессовой

патологией, так и у животных, подвергшихся воздействию острого и хронического стресса.

Механизмы таких иммунных дисфункций, их вклад в патогенез связанных со стрессом заболеваний, а также зависимость интенсивности постстрессового воспаления от генетически детерминированных особенностей нервной системы не выяснены.

Цель данной работы: оценить динамику развития постстрессорного воспаления по изменению лейкоцитарного состава крови в зависимости от генетически детерминированного уровня возбудимости нервной системы у крыс.

Исследование проводили на самцах крыс двух линий, селективированных по величине порога возбудимости нервной системы — линия ВП (высокий порог возбудимости) и НП (низкий порог возбудимости). В качестве модели психоэмоционального стресса использовали протокол длительного эмоционально-болевого воздействия по Гехту. Крыс помещали в прозрачную камеру с электрифицированным решетчатым полом. На протяжении 15 дней животные ежедневно в течение 13 минут подвергались действию стрессора: с интервалом в 1 минуту подавали световые сигналы, часть из которых подкреплялись ударами электрического тока, а часть — нет. Сочетание этих сигналов каждый день являлось непредсказуемым для животных.

Для отслеживания динамики изменений лейкоцитарной формулы были выбраны три временные точки: 24 часа, 7 дней и 24 дня после окончания действия стрессора. Морфологический анализ крови проводили с целью определения лейкограммы, для чего подсчитывали лейкоциты в мазке крови, окрашенной по Романовскому-Гимзе.

Данное исследование выявило постстрессорное увеличение количества нейтрофилов в крови крыс с генетически детерминированным высоким уровнем возбудимости нервной системы в отличие от животных с низким уровнем возбудимости нервной системы.

Таким образом, наследственно обусловленная высокая возбудимость нервной системы является фактором риска развития воспалительных процессов под влиянием психоэмоционального стресса.

В.А. Никитина, Д.В. Крицкая, А.П. Шварц,
Е.А. Вениаминова, В.С. Шавва, С.А. Апрытин,
М.Н. Карпенко, К.П. Щербакова, А.Н. Трофимов
**УЛУЧШЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПАМЯТИ КРЫС
ПРИ ВВЕДЕНИИ СРЕДНЕЦЕПЕЧНЫХ
ТРИГЛИЦЕРИДОВ СОПРОВОЖДАЕТСЯ
УСИЛЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ NMDA-
И АМРА-РЕЦЕПТОРОВ В КОРЕ МОЗГА**

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

V.A. Nikitina, D.U. Krytskaya, A.P. Schwarz,
E.A. Veniaminova, V.S. Shavva, S.A. Apryatin,
M.N. Karpenko, K.P. Shcherbakova, A.N. Trofimov
**MEMORY IMPROVEMENT RESULTING
FROM THE MEDIUM CHAIN TRIGLYCERIDE
TREATMENT IS ACCOMPANIED BY ELEVATED
CORTICAL NMDA AND AMPA RECEPTOR GENE
EXPRESSION IN THE RAT BRAIN**

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg,
Russia

v.a.n1kitina@yandex.ru

Одним из наиболее изучаемых способов коррекции когнитивных нарушений является введение организма в состояние кетоза, при котором в качестве источника энергии клетками используются кетоновые тела, получаемые при окислении жиров. Кетоз достигается при соблюдении кетогенной диеты с преобладанием в рационе жиров и ограничением потребления углеводов, что может приводить к повреждениям различных органов. Потребление среднецепочечных триглицеридов (СЦТ) обеспечивает развитие кетоза без изменения рациона питания и представляется многообещающим способом улучшения когнитивной функции. Ключевым механизмом обучения является усиление синаптической передачи, обеспечиваемое увеличением количества и изменением субъединичного состава ионотропных глутаматных NMDA- и AMPA-рецепторов при развитии долговременной потенциации. Влияние кетоза на состав и количество данных рецепторов требует изучения.

Цель — анализ влияния СЦТ на показатели памяти животных и уровень экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в медиальной префронтальной коре (мПФК).

Работа проведена с соблюдением Директивы 2010/63/ЕС на половозрелых крысах-самцах Вистар, содержащихся в стандартных условиях. Животных протестировали в Y-образном лабиринте, Открытом поле, тесте «Новые предметы». В течение 2 недель у группы крыс изымали корм на 6 ч/сут и орogaстрально вводили 2 мл/кг СЦТ (контроль — корм *ad libitum*, введение воды), затем тесты повторили, добавив водный лабиринт Морриса. Уровни генной экспрессии определяли методом ОТ-ПЦР. Статистическая обработка: RM-ANOVA, t-тест, Манна-Уитни, $p < 0,05$.

При повторном тестировании в Y-образном лабиринте доля спонтанных альтернатив в контрольной группе снизилась, а в группе СЦТ — не изменилась, свидетельствуя о положительном эффекте введения СЦТ на рабочую память. В Открытом поле наблюдали более выраженное угашение исследовательской активности после введений СЦТ в сравнении с контролем, что говорит о лучшем запоминании окружающей обстановки. По обследованию новых предметов различий не выявлено. В водном лабиринте Морриса динамика обучения поиску скрытой платформы в первые 4 дня не различалась. В тестовой попытке на 5-й день животные, получавшие СЦТ, проводили больше времени в целевом секторе по сравнению с контролем, свидетельствуя об улучшении пространственной памяти. В мПФК животных, получавших СЦТ, выявлена более высокая экспрессия генов GluN2a- и GluN2b-субъединиц NMDA-рецепторов и GluA1- и GluA2-субъединиц AMPA-рецепторов по сравнению с контрольной группой, свидетельствуя о более активных процессах консолидации памяти при введении СЦТ.

Таким образом, потребление среднецепочечных триглицеридов в дозах, приводящих к развитию кетоза, требует дальнейшего изучения и может быть предложено в качестве способа улучшения когнитивной функции.

Работа поддержана Российским научным фондом (РНФ, проект № 19-75-10076).

Е.А. Олейник, А.А. Наумова, М.В. Глазова
РОЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОТЕИНАКИНАЗЫ C-ABL И БЕЛКА P53 В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВАЦИИ ERK1/2 КАСКАДА

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

E.A. Oleinik, A.A. Naumova, M.V. Glazova
THE ROLE OF THE INTERACTION BETWEEN PROTEINKINASE C-ABL AND PROTEIN P53 IN THE REGULATION OF ACTIVATION OF THE ERK1/2 CASCADE

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, St-Petersburg, Russia

ekaterina.oleinik96@mail.ru

Известно, что p53 является транскрипционным фактором и контролирует экспрессию множества генов. С другой стороны, p53 также работает и как цитоплазматический белок. При этом его активность зависит не только от посттрансляционных изменений, но и от прямых белковых взаимодействий, и одним из белков, связывающихся с p53 и регулирующих его активность, является c-Abl.

Было показано, что c-Abl и ERK1/2 функционально связаны. В свою очередь опубликованные данные свидетельствуют об активирующем влиянии p53 на ERK1/2 сигнальный каскад. Исходя из этого, можно предположить, что активирующее влияние p53 на ERK1/2 каскад опосредуется c-Abl. Таким образом, наличие функциональных связей между p53 и c-Abl, p53 и ERK1/2, и c-Abl и ERK1/2 объединяет их в тесно связанное функциональное трио, однако это третичное взаимодействие до сих пор остается не изученным.

В данной работе было проведено исследование внутриклеточных механизмов, опосредующих влияние p53 на активность ERK1/2 в экспериментах с использованием различных сочетаний блокаторов и/или активаторов p53, c-Abl и членов ERK1/2 каскада. В качестве модели исследования мы выбрали клетки линии PC12. Оценка количества исследуемых белков и их активных форм осуществлялась с использованием Western Blot анализа.

Полученные результаты показали, что p53 оказывает активирующее влияние на ERK1/2 каскад как опосредованно, в составе комплекса p53/c-Abl, и активируя Trk рецепторы, так и независимо от c-Abl, влияя на ERK1/2 каскад на уровне или выше cRaf. Также на основании полученных нами данных можно предположить, что применение различных сочетаний блокаторов и/или активаторов p53, c-Abl и членов ERK1/2 каскада может стать основой для разработки комплексной терапии для лечения нейродегенеративных состояний.

Работа выполнена при поддержке Гос.задания по теме № 075-00776-19-02 и при использовании ЦКП ИЭФБ РАН № 441590.

Литература:

1. Zosen, D. V., & Glazova, M. V. (2014). Role p53 and MAPK signaling integration in the regulation of PC12 cell neural differentiation. *Russ Fiziol Zh Im IM Sechenova*, 100(12), 1431–1442.
2. Levav-Cohen, Y., Goldberg, Z., Zuckerman, V., Grossman, T., Haupt, S., & Haupt, Y. (2005). C-Abl as a modulator of p53. *Biochem Biophys Res Commun*, 331(3), 737–749. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.152

3. Brown A., Browes C., Mitchell M., Montano X. c-abl is involved in the association of p53 and trk A. *Oncogene*. 19 (26): 3032-40. 2000.
4. Long J., Liao G., Yinna Wang Y., Tang D.D. Specific protein 1, c-Abl and ERK1/2 form a regulatory loop. *J. Cell Science*. 132. doi:10.1242/jcs.222380. 2019.
5. Lee S.W., Fang L., Igarashi M., Ouchi T., Lu K.P., Aaronson S.A. Sustained activation of Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase cascade by the tumor suppressor p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97 (15): 8302-5. 2000.

**М.Б. Пази¹, Д.В. Белан¹,
Е.Ю. Комарова², И.В. Екимова¹**

**МЕХАНИЗМ РЕАЛИЗАЦИИ ЗАЩИТНОГО
ДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОЗО-РЕГУЛИРУЕМОГО
БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА GRP78**

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

² *Институт Цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия*

M.B. Pazi¹, D.V. Belan¹, E.Yu. Komarova², I.V. Ekimova¹

**MECHANISMS OF THE NEUROPROTECTIVE
EFFECTS OF GLUCOSE-REGULATED HEAT
SHOCK PROTEIN GRP78**

¹ *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St-Petersburg, Russia*

² *Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia*

pazimariia@gmail.com

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) — хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое относится к числу неизлечимых. Основная причина гибели нейронов при БП — образование и накопление в клетках токсичных олигомеров и агрегатов белка α -синуклеина. Накопление цитотоксических форм α -синуклеина вызывает протеотоксический стресс эндоплазматического ретикулума (ЭР), который приводит к гибели нейронов по пути апоптоза. Шаперон GRP78 является главным модулятором ответа стресса ЭР, что может играть роль в восстановлении протеостаза клетки и защиты ее от гибели. Цель исследования — оценка возможного нейропротективного действия экзогенного белка GRP78 и молекулярных механизмов его реализации в модели доклинической стадии БП у крыс.

Методы. Работа выполнена на самцах крыс популяции Вистар (n = 30) в возрасте 7 мес (280–300 г.). Для создания модели БП применены микроинъекции в компактную часть черной субстанции (кЧЧС) селективного ингибитора протеасом лактацистина (ЛЦ). Рекомбинантный белок GRP78 человека вводился интраназально дважды после ЛЦ и через неделю после его последней микроинъекции. Контрольная группа животных получала растворитель GRP78. Для анализа патоморфологических и нейрохимических изменений в кЧЧС применяли методы иммуногистохимии и биохимии. Для оценки способности GRP78 проникать в мозг при интраназальном введении, GRP78 был помечен флуоресцентным красителем Alexa555*. Статистический анализ данных осуществлялся с помощью параметрического

дисперсионного анализа ANOVA с последующим LSD тестом.

Показано, что через 3 ч после интраназального введения меченый GRP78 проникает в паренхиму и интернализуется дофамин (ДА)-ергическими нейронами кЧЧС. Это позволило применить его для терапии в модели БП у животных. Модель доклинической стадии БП характеризовалась гибелью 27% ДА-ергических нейронов в кЧЧС, повышением содержания в выживших нейронах общей фракции растворимого α -синуклеина и его фосфорилированной формы по ser129 на 25% и 21% соответственно, сопряженного с развитием стресса ЭР. О развитии стресса ЭР свидетельствовало повышение содержания GRP78 и маркеров PERK-зависимого каскада — проапоптического белка CHOP (C/EBP homologous protein) и расщепленной каспазы-3 (cIcas3) в пределах 20–25% по сравнению с контролем. Проведение терапии с GRP78 в модели БП у крыс препятствовало развитию нейродегенерации. Выяснено, что нейропротективное действие GRP78 связано с его способностью: а) предотвращать образование патологических форм белка α -синуклеина (агрегированных и фосфорилированных ser129), б) уменьшать стресс ЭР и апоптоз. Полученные данные свидетельствуют о нейропротективной значимости повышения содержания GRP78 в головном мозге при развитии Паркинсон-подобной патологии.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290427-7).

**Е.И. Пчицкая¹, И.С. Крылов¹, И.Б. Безпрозванный^{1,2}
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛЕННЫХ
ЗНАЧЕНИЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ
ПАРАМЕТРОВ ДЕНДРИТНЫХ ШИПИКОВ
НА КОНФОКАЛЬНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЯХ
НЕЙРОНОВ**

¹ *Лаборатория Молекулярной Нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

² *Кафедра физиологии, Юго-Западный Медицинский Центр Университета Штата Техас, Даллас, США*

**E.I. Pchitskaya¹, I.S. Krylov¹, I.B. Bezprozvanny^{1,2}
QUANTIFICATION OF DENDRITIC SPINES
MORHOLOGICAL PARAMETRS ON CONFOCAL
NEURONAL IMAGES**

¹ *Laboratory of Molecular Neurodegeneration, Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russian Federation*

² *Department of Physiology, UT Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX, USA*

pchitskaya_ei@spbstu.ru

Взаимодействие между нейронами головного мозга осуществляется через специализированный контакт — синапс, который формируется между аксоном и дендритом, передающим и принимающим сигнал соответственно. Со стороны дендрита синапс представлен особым мембранным выростом — дендритным шипиком. Дендритные шипики являются динамичными структурами, принимающими различную форму, которая непосредственно связана с их функциональным состоянием. Анализ морфологии дендритных шипиков является важным этапом при выполнении фундаментальных исследований о функционировании синапсов, а также

для изучения механизмов возникновения и развития нейродегенеративных и психиатрических заболеваний. Классическим подходом к анализу морфологии дендритных шипиков, является классификация на заранее определенные схожие морфологические группы — тонкие, пеньковые, грибовидные шипики, а также филоподии. Подобный подход характеризуется высоким процентом ошибок ввиду сложности формы оцениваемых объектов и недостатками алгоритмов классификации, а также не способен отразить малые изменения в форме дендритных шипиков [1]. Отмечается, что непосредственная оценка численных значений параметров морфологии дендритных шипиков позволит производить анализ их морфологии с значительно большей точностью [2], однако широкое применение подобного подхода затруднено ввиду того, что средние размеры шипиков меньше или сопоставимы с теоретическим пределом разрешения конфокального микроскопа, а также из-за дефицита доступного программного обеспечения для проведения подобных исследований. Авторы разработали методический подход, позволяющий уточнить структуру дендритных шипиков на конфокальных изображениях нейронов, заключающийся в деконволюции с помощью экспериментально определенной функции рассеяния точки, и плагин для программного обеспечения ImageJ, позволяющий осуществить измерение основных морфологических параметров дендритных шипиков на двумерной проекции изображения нейрона.

This research work was supported by the Academic Excellence Project 5–100 proposed by Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University. На разработанное программное обеспечение получено Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2019662038 от 16 сентября 2019 года.

Литература:

1. Pchitskaya E.I., Krylov I.S., Vlasova O.L. et al. Analysis of dendritic spines morphology: from classical division to types toward alternative approaches. St. Petersburg Polytechnical State University Journal. Physics and Mathematics 2019; 12(2): 86–97.
2. Ruzsyczki B., Szepesi Z., Wilczynski G.M., Bijata M., Kalita K., Kaczmarek L. et al. Sampling issues in quantitative analysis of dendritic spines morphology. BMC bioinformatics. 2012; 13: 213.

В.А. Разенкова, Д.Э. Коржевский

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГАМК-ЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ В КОНЦЕ ПЕРВОЙ НЕДЕЛИ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины», Санкт-Петербург, Россия

V.A. Razenkova, D.E. Korzhevskii

MORPHOLOGICAL PECULIARITIES OF GABA-ERGIC BRAIN SYSTEM IN FIRST WEEK RATS

FSBRI "Institute of Experimental Medicine", Saint-Petersburg, Russia

valeriya.raz@yandex.ru

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), является одним из главных тормозных медиаторов центральной нервной системы (ЦНС) и, наряду с глутаматом, играет

ключевую роль в регуляции сложных нейронных сетей. Кроме того, ряд авторов показал, что в первый месяц постнатального развития ГАМК функционирует в качестве возбуждающего, а не тормозного нейротрансмиттера. Однако особенности формирования ГАМК-ергических структур ЦНС в раннем постнатальном развитии остаются малоизученными.

Целью данного исследования было изучение морфологических изменений в ГАМК-ергической системе в коре головного мозга крыс в конце первой недели постнатального развития.

В качестве объекта исследования использовали крыс-самцов линии Вистар. Для работы использовали 7-дневных и половозрелых крыс ($n=3$ для каждой стадии). Препараты окрашивали толудиновым синим по методу Ниссля. Идентификацию антигена проводили с использованием моноклональных мышинных антител к GAD67 (Abcam, Великобритания), который является специфическим маркером ГАМК-ергических структур мозга. Полученные препараты анализировали с помощью микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия). Анализ производили с использованием программ ImageJ (National Institutes of Health, США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., США).

В результате реакции чётко выявляются ГАМК-ергические нейроны и синаптические терминалы. Было показано, что у взрослых крыс большое количество GAD67-положительных терминалей расположено в IV-V слое коры головного мозга. Эти окончания сосредоточены в основном на телах и отростках пирамидальных нейронов. Также выявлено, что ингибиторные нервные окончания могут образовываться и на соме и отростках ГАМК-ергических нейронов.

У молодых животных наиболее интенсивно окрашивается верхний слой коры, в котором наблюдается большое скопление ГАМК-ергических синапсов, но не тел нейронов. Тела нейронов находятся в нижележащих слоях кортекса. Однако в области цингулярной коры тела клеток с выраженной цитоплазматической реакцией GAD67 также выявляются и в I слое. Показано, что процент ГАМК-ергических клеток с возрастом увеличивается (u -критерий, $p=0,002$), в то время как площадь тел нейронов уменьшается (u -критерий, $p=0,02$).

Полученные данные характеризуют изменения активности ГАМК-ергической системы в ходе постнатального онтогенеза. Созревание ГАМК-ергических структур в нижних слоях коры происходит быстрее, чем в верхних, что соответствует данным о развитии коры изнутри наружу. Наличие ГАМК-ергических нейронов, по-видимому, является критическим для развития цингулярной коры в этот период. Уменьшение площади тел ГАМК-ергических клеток у половозрелых животных по сравнению с новорождёнными, вероятно, связано с созреванием нейронов.

А.В. Раковская, Е.И. Пчицкая, И.Б. Безпрозванный
ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА EB3 ВЫЗЫВАЕТ
УВЕЛИЧЕНИЕ РАЗМЕРА КЛАСТЕРОВ БЕЛКА
PSD95 В ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ

*Лаборатория Молекулярной Нейродегенерации,
 Санкт-Петербургский политехнический университет
 Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

A.V. Rakovskaya, E.I. Pchitskaya, I.B. Bezprozvanny
OVEREXPRESSION PROTEIN EB3 CAUSES
AN INCREASE IN SIZE OF CLUSTERS PROTEIN
PSD95 IN HIPPOCAMPAL NEURONS

*Laboratory of Molecular Neurodegeneration, Peter
 the Great Saint-Petersburg Polytechnic University,
 Saint-Petersburg, Russian Federation*

jonatepl@gmail.com

Микротрубочки представляют собой динамические полярные биополимеры. Белок End-binding protein 3 (EB3) — член семейства +TIP (plus-end tracking proteins) белков, связывается с плюс-концом микротрубочек и регулирует их динамику [1]. Наиболее распространенным белком, формирующим каркас постсинаптической плотности в дендритных шипиках нейронов, является белок постсинаптической плотности 95 (PSD95) [2]. Взаимодействие белков EB3 и PSD95 влияет на динамику микротрубочек и ветвление дендритов в нейронах [3]. Произведена оценка влияния взаимодействия белков PSD и EB3 на формирование нанокластеров белка PSD95 в дендритах гиппокампальных нейронов. Гиперэкспрессия EB3 в гиппокампальных нейронах *in vitro* достигалась путем трансдукции лентивирусными частицами, сборка которых осуществлялась в клетках линии HEK293T. Для визуализации дендритов и кластеров белка PSD95 применялось иммуноцитохимическое окрашивание с использованием первичных антител к MAP2 (1:1000, Millipore) и PSD95 (1:300, ThermoFisher), вторичных антител Alexa Fluor 594 (1:1000, Invitrogen) и Alexa Fluor 488 (1:1000, Invitrogen). Обработка серии конфокальных изображений, полученных на микроскопе Thorlabs (2016 × 2016 пикселя, разрешение 0,034 мкм/пиксел), производилась в программном обеспечении Fiji. Выделение границ дендрита осуществлялось путем бинаризации изображения MAP2, методом минимальной перекрестной энтропии Ли. Производилась детекция кластеров изображения PSD95, предварительно обработанного фильтром «Rolling ball» для уменьшения шума, с помощью алгоритма Лапласа и далее приводилось к бинарному виду путем использования функции «Convert to Mask». Вычитание бинарных масок изображений позволяет исключить кластеры за пределами дендрита [4]. Анализ данных, полученных с помощью описанного выше алгоритма, продемонстрировал, что гиперэкспрессия белка EB3 увеличивает площадь кластеров белка PSD95 в дендритах гиппокампальных нейронов. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что распределение данного структурного белка в нейроне регулируется динамическим тубулиновым цитоскелетом.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-15-00184 (Безпрозванный И.Б.).

Литература:

- van de Willige D, Hoogenraad CC, Akhmanova A. Microtubule plus-end tracking proteins in neuronal development, *Cell Mol Life Sci.* 2016. 73.
- Cheng D. et al. Relative and Absolute Quantification of Postsynaptic Density Proteome Isolated from Rat Forebrain and Cerebellum. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2006. 5:1158–70.
- Sweet, E.S. et al. PSD-95 alters microtubule dynamics via an association with EB3, *J Neurosci.* 2011. 31:1038–1047.
- Rebollo, Elena & Boix-Fabrés, Jaume & Arbones, Maria. Automated Macro Approach to Quantify Synapse Density in 2D Confocal Images from Fixed Immunolabeled Neural Tissue Sections. *Methods in molecular biology.* 2019. 2040:71–97.

M. Ryazantseva^{1,2}, **J. Englund**^{1,2}, **S.E. Lauri**^{1,2}

KAINATE-TYPE OF GLUTAMATE RECEPTORS
REGULATE WIRING OF INTRINSIC
GLUTAMATERGIC CONNECTIVITY IN THE
AMYGDALA

¹ *Molecular and Integrative Biosciences Research Program, University of Helsinki, Finland*

² *Neuroscience Center, University of Helsinki, Finland*

mariaandreevna@gmail.com

Perturbed information processing in the amygdala has been implicated in developmental neuropsychiatric disorders. However, little is known on the mechanisms that guide formation and refinement of intrinsic connections between amygdaloid nuclei in neonatal brain. We examined the developmental pattern of glutamatergic connection from basolateral to central amygdala (BLA-CeA) in rodents. The electrophysiology and post-hoc confocal microscopy revealed that it develops rapidly during the first ten postnatal days, before external inputs underlying amygdala dependent behaviors emerge. Kainate-type glutamate receptors are suggested to be involved in pathological mechanisms of autism spectrum disorder, Down's syndrome, bipolar disorder and schizophrenia. FISH and qPCR demonstrated high expression levels of kainate-type of ionotropic glutamate receptors in BLA during the restricted period of intensive synaptic development. Electrophysiological experiments demonstrated that tonically active KARs regulate glutamate release in neonatal amygdala via a non-canonical G-protein dependent mechanism. Genetic manipulation of the endogenous KAR activity by conditional knock-out in newborn BLA and knock-down or overexpression in the LA *in vivo* perturbed development of glutamatergic input to CeA. The KAR activity affects BLA-CeA connectivity by specifically regulating synaptic maturation and morphology of GABAergic neurons in CeA. Altogether data demonstrate KARs to be involved in physiological mechanism regulating developmental wiring and maturation of the intrinsic glutamatergic circuitry in the amygdala.

П.И. Семенюк, А. Софронова

**ВЛИЯНИЕ ГЛИКИРОВАНИЯ
НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-
ФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ С ПАРТНЕРАМИ,
ВОВЛЕЧЕННЫМИ В РАЗВИТИЕ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ**

*НИИ Физико-Химической Биологии
им. А.Н. Белозерского, Московский Государственный
Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

P.I. Semenyuk, A. Sofronova

**INFLUENCE OF GLYCATION
ON GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE
DEHYDROGENASE INTERACTION
WITH PARTNERS INVOLVED
IN NEURODEGENERATION**

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

psemenyuk@belozersky.msu.ru

Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (ГАФД) — гликолитический фермент, выполняющий, помимо «основной», множество других важных функций, и взаимодействующий со множеством макромолекул. Один из таких партнеров — альфа-синуклеин, взаимодействии ГАФД с которым вовлечено в развитие болезни Паркинсона [1]. В последнее время появились данные о том, что нейродегенеративные заболевания могут быть ассоциированы с другими связанными со старением заболеваниями, такими, как диабет, одним из ключевых молекулярных маркеров которого является интенсивное гликирование белков. В данной работе с помощью молекулярного моделирования и экспериментальных методов мы исследовали взаимодействие ГАФД с альфа-синуклеином и влияние гликирования обоих белков на это взаимодействие. Показано, что альфа-синуклеин связывается с положительно заряженной «бороздкой» ГАФД, включающей активный центр и сайт связывания кофактора, конкурируя с ним. Гликирование альфа-синуклеина усиливает взаимодействие с ГАФД и вызывает инактивацию фермента [2], в то время как гликирование ГАФД, наоборот, затрудняет связывание. Поскольку связывание во многом определялось электростатическими взаимодействиями (а гликирование затрагивает как раз положительно заряженные аминокислотные остатки), было исследовано также взаимодействие ГАФД с другим важным партнером — РНК, связанное с изменением компартментализации ГАФД в процессе окислительного стресса и вызванном им апоптозом [1, 3]. Гликирование ингибировало связывание ГАФД с РНК.

Полученные данные указывают на возможный механизм взаимосвязи между диабетом и развитием синуклеинопатий, в которые вовлечены ГАФД и альфа-синуклеин. Кроме того, исследуемая система — отличный пример влияния пост-трансляционных модификаций, связанных с изменением заряда участка поверхности белка, на его поведение и взаимодействие с другими биомолекулами, многие из которых представляют собой заряженные полимеры [4].

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-74-00013.

Литература:

1. V. Muronetz, K. Barinova, Y. Stroylova, P. Semenyuk, E. Schmalhausen, *Int.J.Biol.Macromol.*, 2017, 100, 55–66.
2. P. Semenyuk, K. Barinova and V. Muronetz, *Int.J. Biol.Macromol.*, 2019, 127, 278–285.

3. V. Muronetz, R. Asryants, P. Semenyuk, E. Schmalhausen, L. Saso, *Curr.Top.Med.Chem.*, 2014, **14** 2520–2528.
4. P. Semenyuk and V. Muronetz, *Int.J.Mol.Sci.*, 2019, **20**, 1252.

И.А. Таржанов¹, А.Е. Згодова^{1,2}, Н.В. Лизунова¹,
З.В. Бакаева¹, Н.М. Грецкая³, В.В. Безуглов³,
А.М. Сурин^{1,4}, В.Г. Пинелис¹

**ВЛИЯНИЕ
N-ДОКОЗАГЕКСАЕНОИЛДОФАМИНА
НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ВНУТРИКЛЕТочный
КАЛЬЦИЙ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ
ПРИ ГЛУТАМАТНОЙ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ**

¹ ФГАУ «НМИЦ Здоровья Детей» Минздрава России, Москва

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

³ ФГБУН ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, РФ

⁴ ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, РФ

I.A. Tarzhanov¹, A.E. Zgodova^{1,2}, N.V. Lizunova¹,
Z.V. Bakaeva¹, N.M. Gretskaya³,
V.V. Bezuglov³, A.M. Surin^{1,4}, V.G. Pinelis¹

**EFFECT OF N-DOSAHENXAENOYL DOPAMINE
ON SURVIVAL AND INTRACELLULAR CALCIUM
IN CULTURED NEURONS AT GLUTAMATE
EXCITOTOXICITY**

¹ National Medical Research Center for Children's Health of the Russian Federation Ministry of Health, Moscow, Russian Federation

² Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University) Moscow, Russian Federation

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

⁴ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

likeman.1998@yandex.ru

Патологические процессы в мозге, сопровождающиеся повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), приводят к гибели нейронов. Нейролипиды, эндогенные производные жирных кислот, могут проявлять нейропротекторные свойства при инсульте, травме мозга и развитии нейродегенеративных заболеваний, когда основной возбуждающий нейромедиатор мозга глутамат (Glu) становится нейротоксином. В данной работе исследовано влияние нейрוליпина N-докозагексаеноилдофамина (DHA-DA), на выживаемость и Ca^{2+} гомеостаз клеток мозга в условиях глутаматной эксайтотоксичности. Первичные нейрональные культуры получали из коры головного мозга 1-дневных крысят Wistar и содержали при 37°C, 100% влажности и 5% CO_2 в течение 10 дней до эксперимента. DHA-DA добавляли за 1 час до Glu (100 мкМ, Gly 10 мкМ, 0 Mg^{2+}) и затем 15 мин вместе с Glu. Измерения $[Ca^{2+}]_i$ производили при помощи флуоресцентного зонда Fura-FF с использованием системы анализа изображений на базе инвертированного микроскопа и мультиволнового возбуждения и регистрации сигналов. Выживаемость культуры определяли через 24 часа после прекращения действия Glu (1 час), измеряя на планшетном ридере оптическую

плотность тетразолия, образовавшегося из водорастворимой формы формазана (WST-тест).

Инкубация с DHA-DA (0,01 или 1 мкМ, 15 мин) не изменяла $[Ca^{2+}]_i$ в покоящихся нейронах. Добавка Glu (100 мкМ, 10 мкМ Gly, 0 Mg²⁺, 15 мин) вызвала развитие отсроченной кальциевой дисрегуляции (ОКД) [1,2], причем предварительное введение низкой концентрации DHA-DA (0,01 мкМ) сокращало на $13 \pm 12\%$ (M \pm SEM) время наступления ОКД и снижало на $12 \pm 4\%$ максимальное увеличение $[Ca^{2+}]_i$. Высокая доза DHA-DA (1 мкМ), не влияла на ЛАГ-период ОКД, но понижала максимальный подъем $[Ca^{2+}]_i$ на $27 \pm 4\%$. Нейролептин в концентрации 0,01 и 1 мкМ увеличивал не менее чем на 18%, и 9% долю клеток, способных восстановить низкую $[Ca^{2+}]_i$ после удаления Glu. Согласно WST-тесту нейротоксический эффект Glu составил $31 \pm 9\%$. DHA-DA (1 мкМ) повышал выживаемость клеток при действии Glu на $29 \pm 4\%$.

Таким образом, DHA-DA (1 мкМ) защищает клетки нейроглиальной культуры из коры мозга крысы от токсического действия Glu. Нейропротекторное действие DHA-DA опосредовано, по крайней мере, отчасти, отдалением наступления ОКД, и, соответственно, увеличением доли нейронов, сохранивших низкую $[Ca^{2+}]_i$ во время действия Glu.

Работа выполнена в рамках грантов РФФИ-КОМФИ 17-00-00106, 17-00-105 и 17-00-00109.

Литература:

1. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2004. V 86. № 2. P.279–351.
2. Bezuglov V.V., Akimov M.G., Gretskeya N.M., Surin A.M., Pinelis V.G., Shram S.I., Vyunova T.V., Shevchenko K.V., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. The study of the neurotropic peptides role in cell responses regulation. В книге: Horizons in Neuroscience Research 2015. С. 151–170.

Н.М. Ткаченко, А.В. Гладков, И.В. Мухина
ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
НЕЙРОСЕТЕВОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК
ГИППОКАМПА ПРИ РАЗРУШЕНИИ
ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МОЗГА

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия

N.M. Tkachenko, A.V. Gladkov, I.V. Mukhina
AGE-DEPENDENT CHANGES IN NEURAL
NETWORK ACTIVITY OF HIPPOCAMPAL
CELLS AFTER THE DESTRUCTION OF THE
EXTRACELLULAR MATRIX OF THE BRAIN

National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod

andrnatmih@gmail.com

Внеклеточный матрикс мозга (ВМК) является важным компонентом, который участвует не просто в построении нервной ткани, а играет роль при передаче информации в нейронных сетях, т. е. способствует самой главной функции мозга [1]. Поэтому исследование внеклеточного матрикса и его компонентов является крайне актуальным.

В предварительных исследованиях [2] было показано, что при разрушении гиалуронидазой перинеурональных сетей происходит изменение нативной электрофизиологической активности нейронных сетей первичной культуры клеток гиппокампа на 17-й день развития *in vitro*, что выражалось в появлении эпилептоподобной активности с длительностью синхронной активности клеток в составе нейронной сети 30–35 с, а также появлением тонических аудиогенных судорог у мышей раннего постнатального периода (P17).

Поскольку явление гиалуронидаза-зависимой эпилептоформной активности наблюдалось как *in vitro*, так и *in vivo* в раннем постнатальном периоде, предположили, что выявленный феномен связан с возрастными изменениями процесса нейрогенеза при разрушении ВМК. Было показано, что через 2 часа после воздействия гиалуронидазы в зрелой первичной культуре клеток гиппокампа (26 день развития *in vitro*) возникает временное уменьшение количества сетевых пачек и рассинхронизация сетевой активности с увеличением количества отдельных спайков. Через 24 часа после добавления гиалуронидазы, сетевая активность повышается за счет увеличения количество коротких сетевых пачек импульсов, растет синхронизация активности с максимальным увеличением синхронизации к 31 дню развития культуры (5 день после добавления гиалуронидазы). К 45 дню развития *in vitro* сетевая активность нормализуется до начальной. При однократном добавлении гиалуронидазы на 26 день развития культуры клеток гиппокампа мыши, возникает временное изменение биоэлектрической активности, которое затем возвращается в исходное состояние (до добавления гиалуронидазы) с изменениями биоэлектрической активности, характерными при старении клеточной культуры. Таким образом, имеет место возраст-зависимое изменение сетевой активности при разрушении гиалуроновой кислоты ВМК, наиболее выраженное в раннем постнатальном нейрогенезе.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 18-44-520016.

Литература:

1. Karamanos, N. K. 2012, pp. 197–208. Extracellular matrix. Pathobiology and signaling / edited by Nikos K. Karamanos. Walter de Gruyter, Berlin.
2. Vedunova M., Sakharnova T., Mitroshina E., Perminova M., Pimashkin A., Zakharov Yu, Dityatev A. and Mukhina I. Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2013 August 7; 149:8. doi: 10.3389/fncel.2013.00149.

А.М. Трофимова^{1,2}, Т.Ю. Постникова^{1,2},
А.В. Зайцев^{1,2}

**ОТСРОЧЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
СИНАПТИЧЕСКОЙ ПОТЕНЦИАЦИИ
В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПОСЛЕ
ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОЛ-ИНДУЦИРОВАННОГО
ЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО СТАТУСА**

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии
имени И.М. Сеченова Российской Академии Наук,
Санкт-Петербург, Россия

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

A.M. Trofimova^{1,2}, T.Y. Postnikova^{1,2}, A.V. Zaitsev^{1,2}

**DELAYED CHANGES IN SYNAPTIC
POTENTIATION OF RAT HIPPOCAMPUS AFTER
PENTYLENETETRAZOLE-INDUCED STATUS
EPILEPTICUS**

¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology
and Biochemistry Russian Academy of Sciences,
Saint-Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic
University, Saint-Petersburg, Russia

alina.trofimova1132@mail.ru

Проблемы с обучением и памятью часто наблюдаются у больных височной эпилепсией (Giovagnoli et al., 1999). Нейронной основой памяти является синаптическая пластичность. Ранее нами было показано, что долговременная потенциация (ДВП) снижена у крыс в течение первой недели после эпилептического статуса (ЭС), вызванного пентилентетразолом (ПТЗ) (Postnikova TY et al., 2019). В этой работе мы исследовали отсроченный эффект перенесенных судорог на синаптическую потенциацию в поле CA1 гиппокампа крыс Вистар через 30 дней после ПТЗ-индуцированного ЭС. Исследование проводилось на переживающих срезах мозга крыс. Полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы отводили от радиального слоя поля CA1 гиппокампа стеклянным микроэлектродом, стимуляцию коллатералей Шафера осуществляли биполярным нихромовым электродом. ДВП вызывали высокочастотной стимуляцией. Достоверность различий у контрольных и экспериментальных крыс проводили с использованием t-критерия.

У контрольных животных высокочастотная стимуляция вызывала выраженную ДВП ($1,49 \pm 0,05$ у.е., $n=11$). У больных животных ДВП была достоверно снижена по сравнению с контролем ($1,25 \pm 0,07$ у.е., $n=14$). Конкурентный антагонист NMDA-рецепторов D-AP5 (50 мкМ) блокировал индукцию ДВП как в контрольных, так и в экспериментальных срезах ($1,02 \pm 0,07$ у.е., $n=6$ и $1,04 \pm 0,10$ у.е., $n=8$ соответственно). Однако при использовании каналоблокатора NMDA-рецепторов МК-801 (10 мкМ) ДВП сохранялась у больных животных ($1,35 \pm 0,09$ у.е., $n=11$) и не вырабатывалась у контрольных ($0,98 \pm 0,05$ у.е., $n=7$), что может указывать на внесинаптическую локализацию NMDA-рецепторов (Sean et al., 2013) после судорог. Известно, что метаболитные глутаматные рецепторы I группы (mGluR1/5) находятся на постсинаптической мембране перисинаптически и влияют на активность NMDA-рецепторов (Scheefhals et al., 2018). Введение антагониста mGluR1 FTICD (5 мкМ) блокировало выработку ДВП у больных крыс ($1,04 \pm 0,06$ у.е., $n=8$) и не влияло на величину пластичности у контрольных ($1,41 \pm 0,07$ у.е., $n=6$). Отсутствие ДВП на фоне FTICD может свидетельствовать

о перисинаптической локализации NMDARs, которые активируются под действием mGluR1 после высокочастотной стимуляции.

Таким образом, мы выявили долговременные нарушения синаптической пластичности, вызванные однократно перенесенными генерализованными судорогами.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-00-00408.

В.Ф. Хузахметова, А.Н. Ценцевицкий,
Э.А. Бухараева

**ВЛИЯНИЕ АДРЕНАЛИНА
НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЕРЕДАЧУ В НЕРВНО-
МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ МЫШИ С МОДЕЛЬЮ
БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА**

Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки "Федеральный исследовательский
центр «Казанский научный центр Российской
академии наук», Казань, Россия

V.F. Khuzakhmetova, A.N. Tsetsevitsky,
E.A. Bukharaeva

**EFFECT OF ADRENALINE ON SYNAPTIC
TRANSMISSION IN NEURO-MUSCULAR
SYNAPSE OF MOUSE WITH MODEL
OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS**

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC
Kazan Scientific Center of RAS

venerik87@mail.ru

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — неизлечимое нейродегенеративное заболевание, приводящее к прогрессирующей слабости скелетных мышц, атрофии, параличу и смерти, вследствие гибели центральных и периферических мотонейронов. Среди наследственных форм заболевания 20% случаев приходится на мутации в гене супероксиддисмутазы-1 (SOD-1). Мутации в гене FUS (*fusion in sarcoma*), являются основной причиной ювенильных форм БАС. Недавние исследования показали, что полной потери белка FUS, как у взрослых мышей, так и в перинатальном периоде, недостаточно для запуска дегенерации двигательных нейронов, однако избыточная экспрессия FUS способна вызвать дегенерацию двигательных нейронов, предполагая, что мутантный белок приобретает токсическую функцию, приводя к агрессивной нейродегенерации.

В последние годы адренергические соединения стали предлагать в качестве лекарственных препаратов для терапии неврологических расстройств, в том числе при лечении БАС. В связи с этим мы исследовали влияние адреналина (АД, 0.1 μ M) на параметры секреции ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах (*n.phrenic* — *m.diaphragm*) животных с моделью ALS-FUS. По сравнению с контрольной группой животных, где действие АД приводило к снижению интенсивности как спонтанной, так и вызванной секреции, в синапсах мутантных животных значимых изменений при аппликации адреномиметика выявлено не было. Амплитудно-временные параметры синаптических ответов достоверно не изменялись при добавлении АД в синапсах животных с моделью ALS-FUS, в то время как у здоровых животных АД увеличивал время нарастания переднего фронта и время спада сигнала. Отсутствие эффекта АД в синапсах

животных с моделью наследственной формы БАС может быть связано с разнонаправленным действием агента на разные подтипы аднерорецепторов, поскольку есть данные о наличии разных подтипов аднерорецепторов в области синаптического контакта. Недавно показано, что активация β 2-аднерорецептора препятствует проявлениям БАС, ингибируя деградацию белка, индуцируя синтез и высвобождение нейротрофического фактора, положительно модулируя микроглиальную и системную иммунную функции, сохраняя структурную и функциональную целостность нервно-мышечного синапса и улучшая энергетический обмен в клетке. Кроме того, β 2-аднерорецепторы ингибируют глутаматную токсичность и кальций-зависимую деградацию белков в мотонейроне, увеличивают синтез белков в мышце и уменьшают ее атрофию, усиливают оксидативные механизмы и митохондриальный биогенез. Поскольку патогенез БАС связан с изменениями нервно-мышечного синапса, то дальнейшее направленное исследование аднергергических соединений может способствовать поиску средств по предотвращению развития БАС.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-15-00046.

Т.А. Хунагов^{1,2}, К.В. Скобелева¹, Е.В. Казначеева¹

НАРУШЕНИЕ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО Кальциевого ВХОДА В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА 5XFAD МЫШЕЙ МОДЕЛИРУЮЩИХ НАСЛЕДСТВЕННУЮ ФОРМУ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

T.A. Khunagov^{1,2}, K.V. Skobeleva¹, E.V. Kaznacheyeva¹

DISTURBANCES OF STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY IN THE HIPPOCAMPAL NEURONS OF 5XFAD MICE MODELING OF FAMILIAR ALZHEIMER'S DISEASE

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

² St. Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

linius777@gmail.com

Наследственная Болезнь Альцгеймера (НБА) — тяжелое нейродегенеративное расстройство, при котором наблюдается отложение агрегатов амилоида бета, а также тау-клубков в гиппокампе и прилежащих к нему субкортикальных областях мозга. НБА характеризуется ранним началом и прогрессивным снижением уровня когнитивных способностей, таких как потеря памяти, нарушение абстрактного мышления, неспособность усвоить новую информацию. Конечным итогом патогенеза НБА является атрофия мозга и как следствие — нарушение всех эскутивных функций.

Основной вклад в развитие НБА вносят мутации в генах PSEN1, PSEN2 и APP, кодирующие пресенилин-1 (PS1), пресенилин-2 (PS2) и белок предшественник амилоида (APP). Было показано, что при болезни Альцгеймера наблюдается нарушение кальциевой сигнализации в нейронах. Важной частью кальциевого гомеостаза клетки является депо-управляемый кальциевый вход (SOCE), реализуемый депо-управляемыми кальциевыми каналами двух типов: CRAC-каналами,

в состав которых входят белки ORAI и менее селективными каналами, образованными белками TRPC. Эти каналы активируются кальциевыми сенсорами (STIM1 и STIM2) в ответ на опустошения кальциевого депо, располагающегося в люмене эндоплазматического ретикулума (ЭР). Целью работы было изучение SOCE в нейронах 5xFAD мышей, моделирующих наследственную форму болезни Альцгеймера.

5xFAD мыши содержат пять мутаций в генах PSEN1 и APP, ассоциированных с НБА. С помощью вестерн-блоттинга анализировался уровень экспрессии генов, ответственных за биосинтез белков, вовлеченных в депо-управляемый кальциевый вход (STIM1, STIM2, ORAI1 и ORAI3) у трансгенных и контрольных мышей соответственно. SOCE оценивали, используя флуоресцентный кальциевый зонд FURA2-AM. Для активации SOCE использовали тапсигаргин — ингибитор Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума (SERCA).

Было показано, что в нейронах 5xFAD мышей увеличен депо-управляемый кальциевый вход, в сравнении с контрольной выборкой. Уровень экспрессии генов, ответственных за биосинтез белков, вовлеченных в SOCE, не менялся. Таким образом, увеличение депо-управляемого кальциевого входа, по всей видимости, связано с регуляцией каналов ORAI и TRPC.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-54-80006 и программой Президиума РАН №19 «Современные проблемы высокотехнологичной медицины».

Д.В. Чернопольская¹, Д.Р. Еникеев¹, Е.В. Герасимова¹, А.В. Захаров^{1,2}

ЭФФЕКТЫ ГОМОЦИСТЕИНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ В ГИППОКАМПе КРЫС IN VIVO

¹ Казанский федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

D.V. Chernopolskaya¹, D.R. Enikeev¹, E.V. Gerasimova¹, A.V. Zakharov^{1,2}

EFFECTS OF HOMOCYSTEINE ON ELECTRICAL ACTIVITY IN RAT HIPPOCAMPUS IN VIVO

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Russia

dvchernopolskaya@mail.ru

Гомоцистеин (ГЦ) является серосодержащей аминокислотой, которая вырабатывается при метаболизме метионина. Повышенные уровни ГЦ в плазме вызваны дефицитом витамина B12.[1] Взаимосвязь между повышенным уровнем ГЦ и эпилептическим припадком у человека остается противоречивой, несмотря на растущие доказательства эффекта гипергомоцистеинемии. Короткая латентность к появлению приступов свидетельствует о вовлечении метаболических продуктов ГЦ.[2]

Цель исследования: изучение эффектов ГЦ на электрическую активность в гиппокампе в условиях in vivo

Материалы и методы. Эксперименты проводились на крысах линии Wistar.

1 группа — р6-7(n=3);

2 группа — р30-90(n=3)

Подготовка животных проходила под изофлурановой анестезией. Животное фиксировали в стереотаксическом аппарате. Проводили распил в области над гиппокампом. 16-канальный электрод помещали в гиппокамп в зоне СА1. В этом же отверстие располагали микроинъектор с раствором ГЦ. Через час после введения производили запись электрической активности в гиппокампе. Апплицировали 2 мкл ГЦ.

ГЦ вводили в дозах 0.015 мг, 0.007 мг и 0.003 в 2 мкл.

Результаты и обсуждение

Эпилептиформная активность не была зарегистрирована в ЭЭГ в контрольных записях.

Латентный период 1 группы достоверно короче, чем у 2 группы и составил (ГЦ 0.003, 0.007, 0.015 мг) 5.23 ± 0.49 , 3.01 ± 0.42 , 2.37 ± 0.6 мин, а у 2 группы 12.2 ± 1.4 , 9.97 ± 1.51 , 10.06 ± 0.58 мин ($p < 0.05$)

Эпилептические всплески у 1 группы были достоверно длительнее и составили 0.9 ± 0.13 , 1.48 ± 0.12 , 1.15 ± 0.09 мин, у 2 группы 0.58 ± 0.09 , 0.51 ± 0.07 , 0.49 ± 0.09 мин ($p < 0.05$)

Эпилептических эпизодов было больше у 1 группы, а время между ними достоверно меньше. Среднее количество эпизодов составило 4.2 ± 0.6 , 3.6 ± 0.3 , 3.14 ± 0.34 , у 2 группы 4.6 ± 0.33 , 3.0 ± 0.7 , 2.3 ± 0.03 ($p > 0.05$) Время между ними 2.9 ± 0.5 , 2.4 ± 0.405 , 2.9 ± 0.308 мин, у 2 группы 5.4 ± 0.854 , 8.62 ± 2.11 , 8.96 ± 1.017 мин ($p < 0.05$)

Различия в пиковой частоте 9.6 ± 0.78 Гц, 8.5 ± 0.67 Гц, 9.3 ± 0.607 Гц; 2 группа 12.37 ± 0.822 Гц, 15.4 ± 1.519 Гц, 14.875 ± 1.042 Гц ($p < 0.01$)

Гомоцистеин в различных концентрациях вызывает эпилепсию в гиппокампе у маленьких животных быстрее и интенсивнее, чем у взрослой группы.

Работа выполнена за счёт средств субсидии, выделенной КФУ для выполнения гос. задания в сфере научной деятельности. Работа поддержана РФФИ № 18-015-00423

Литература:

1. Ansari R. et al. Hyperhomocysteinemia and neurologic disorders. *J Clin Neurol.* 2014; 10(4):281–8.
2. Kubova H. et al. Seizures induced by homocysteine in rats during ontogenesis. 1995; 36(8):750–6.

М.В. Черныш¹, В.В. Гусельникова²,
Д.Э. Коржевский^{1,2}

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕРМЕНТА ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗЫ В КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРОЛИКА

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

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

M.V. Chernysh¹, V.V. Gusel'nikova²,
D.E. Korzhevskii^{1,2}

FEATURES OF THE GLUTAMIN SYNTHETASE ENZYME DISTRIBUTION IN RABBIT BRAIN CELLS

¹ FSBI HE "Saint Petersburg State University", Saint Petersburg, Russia

² FSBSI "Institute of Experimental Medicine", Saint Petersburg, Russia

chernysh.mariah@gmail.com

Глутаминсинтетаза (англ. *glutamine synthetase*, GS) является ключевым ферментом глутамат-глутаминового цикла, в ходе которого внеклеточный глутамат, обладающий нейротоксичными свойствами, с помощью GS преобразуется в нетоксичный глутамин. Эта же реакция служит для инактивации избытка нейротоксичного аммиака. В мозге GS синтезируется преимущественно астроцитами и традиционно используется в качестве функционального маркера этой клеточной популяции.

Целью данного исследования стало изучение распределения GS в клетках стриатума и субкортикального белого вещества головного мозга кролика. **Материалом** для исследования служили образцы головного мозга половозрелых кроликов-самцов породы Шиншилла (n=5). Работа выполнена с применением методов иммуноцитохимии и конфокальной лазерной микроскопии. В качестве первичных реагентов использовали смесь козьих поликлональных антител против глиального фибриллярного кислого белка, GFAP (Abcam, UK) и мышиных моноклональных антител (клон GS-6) против GS (Milipore, USA).

Результаты. В головном мозге кролика GS экспрессируется двумя разными типами клеток. В стриатуме GS присутствует исключительно в астроцитах, что подтверждается наличием в GS-иммунопозитивных клетках астроцитарного маркера GFAP. GS характеризуется дискретным распределением и выявляется в виде многочисленных мелких скоплений во всех участках перинуклеарной цитоплазмы астроцитов, а также в крупных и мелких клеточных отростках. В субкортикальном белом веществе часть клеток также характеризуется наличием в цитоплазме и GFAP, и GS. По морфологическим характеристикам эти GFAP+/GS+ клетки соответствует астроцитам. При этом интенсивность флуоресценции GS в этих клетках существенно ниже по сравнению с клетками стриатума. Помимо GFAP+/GS+ клеток, в белом веществе были выявлены GS-иммунопозитивные клетки, характеризующиеся отсутствием GFAP и по морфологическим особенностям соответствующие олигодендроцитам.

Заключение. В рамках представленной работы впервые выявлены характерные особенности распределения фермента глутаминсинтетазы в клетках разных областей головного мозга кролика. Выявленные различия могут отражать функциональные особенности клеток изученных областей.

А.А. Чесноков^{1,2}, Р.В. Галлямутдинов^{1,2}

АНАЛИЗ ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ОТНОШЕНИЯ В КЛЕТКАХ ПУРКИНЬЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

¹ Многопрофильный центр лазерной медицины, Челябинск, Россия

² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

A.A. Chesnokov^{1,2}, R.V. Gallyamutdinov^{1,2}

ANALYS OF THE NUCLEAR-CYTOPLASMIC RATIO IN THE CELLS OF PURKINJE AT THE EXPERIMENTAL TYPE 1 DIABETES

¹ Multifunction center of the laser medicine, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk state University, Chelyabinsk, Russia

NeroAsquaro@prorotonmail.com

Актуальность. В современном урбанизированном мире одной из злободневных медицинских проблем является сахарный диабет (СД).

СД 1 типа — это тяжелое аутоиммунное заболевание эндокринной системы, которое характеризуется деструкцией β — клеток поджелудочной железы. СД оказывает комплексное негативное влияние на все органы и системы. Одной из многочисленных мишеней его влияния является нервная система, в частности мозжечок.

Мозжечок — это важнейший орган центральной нервной системы, отвечающий за равновесие и мышечный тонус.

Целью настоящего исследования является анализ ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) грушевидных нейронов Пуркинье при экспериментальном СД 1 типа.

Материал и методы. В эксперименте использовались белые лабораторные крысы линии Wistar в количестве 14 особей обоих полов. Постановка стрептозотоцинового СД 1 типа осуществлялась по общепринятой методике. Для достижения поставленной цели были использованы гистологические, морфометрические и статистические методы исследования. На полученных гистологических препаратах был произведен подсчет ЯЦО грушевидных нейронов Пуркинье с помощью программы ImageScore M, после чего проводилась статистическая обработка данных методом Манна-Уитни.

Результаты. Нами было установлено, что ЯЦО в грушевидных нейронах Пуркинье у животных опытной группы увеличивалось по сравнению с животными контрольной группы с существенным различием в 48.8%. (Контроль $73.26 \pm 6.43\%$, опыт $109.04 \pm 15.33\%$, $p \leq 0.05$). ЯЦО является морфологической характеристикой, позволяющей оценить уровень метаболизма и проявления компенсаторных реакций [1], поэтому увеличение ЯЦО при СД 1 типа косвенно свидетельствует о нарушении функциональной активности нейронов Пуркинье.

Выводы. Таким образом было выявлено достоверное повышение ЯЦО грушевидных нейронов Пуркинье при экспериментальном сахарном диабете 1 типа.

Литература:

1. Selvarajah D, Wilkinson ID, Davies J, Gandhi R, Tesfaye S. Central nervous system involvement in diabetic neuropathy. *Curr Diab Rep.* 2011;11:310–322.
2. Drolet RE, Sanders JM, Kern JT. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) cellular biology: a review of recent advances in identifying physiological substrates and cellular functions. *J Neurogenet.* 2011;25:140–151.

А.В. Чурилова, Т.Г. Зачепило

ОЦЕНКА АКТИВАЦИИ АУТОФАГИИ В МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки Институт физиологии имени И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

A.V. Churilova, T.G. Zachepilo

THE ASSESSMENT OF AUTOPHAGY ACTIVATION IN THE RAT BRAIN AFTER HYPOBARIC HYPOXIA EXPOSURE

Pavlov Institute of physiology of RAS, Saint-Petersburg, Russia

annch05@mail.ru

Аутофагия — внутриклеточный механизм деградации цитоплазматических молекул и органелл в аутофагосомах, осуществляющий регуляцию равновесия между уровнем распада и синтеза клеточных компонентов, что необходимо для поддержания клеточного гомеостаза. Аутофагия имеет исключительно большое значение для нормального функционирования нейронов. Гипоксия является ведущим компонентом патогенеза многих неврологических нарушений и заболеваний, в том числе инсульта головного мозга. Изучение процессов аутофагии в нейронах в условиях действия гипоксии имеет фундаментальное значение и представляет практический интерес с точки зрения разработки профилактических методик для коррекции постгипоксических состояний. Целью настоящего исследования было выявление маркеров аутофагии (LC3, p62, HSC70), а также оценка интенсивности протекания аутофагии после действия тяжелой гипобарической гипоксии (ТГГ, 180 мм рт ст., 3 ч) в неокортексе и гиппокампе мозга крыс. Исследование выполнено на крысах-самцах линии Вистар (200–220 г), полученных из ЦКП Биокolleкция ИФ РАН. Клеточную локализацию исследуемых маркеров (нейрональную, глиальную) оценивали иммуногистохимическим методом с использованием флуоресцентной метки на конфокальном микроскопе в ЦКП ИФ РАН. Количественный анализ выполняли путем измерения оптической плотности иммунопозитивных объектов. Установлено, что экспрессия LC3, p62 и HSC70 сосредоточена в нейронах, но не глиальных клетках мозга крыс. Было выявлено, что ТГГ приводит к снижению содержания исследуемых маркеров аутофагии через 1 сутки после воздействия, что связано с усилением деградации данных белков при активации аутофагии. К 3 суткам после ТГГ уровни LC3, p62 и HSC70 восстанавливались до контрольного значения. Методом RT-PCR было обнаружено усиление транскрипции генов *map1lc3b* (ген белка LC3) и *Tfeb* (ген транскрипционного фактора TFEB) в гиппокампе, но не неокортексе крыс, через 3 суток после ТГГ. Обнаруженный факт свидетельствует о том, что возвращение уровней LC3, p62 и HSC70 к контрольным значениям через 3 суток после ТГГ происходит за счет активации экспрессии генов, в частности *map1lc3b* и *Tfeb*, в поле CA1 гиппокампа. Таким образом, анализ полученных данных позволяет сделать заключение о том, что процесс аутофагической деградации молекул усиливается действием ТГГ в нейронах, но не глиальных клетках, неокортексе и гиппокампа крыс. Это проявляется снижением содержания LC3, p62 и HSC70 через 1 сутки после ТГГ, вслед за которым происходит компенсаторное усиление транскрипции генов *map1lc3b* и *Tfeb* (3 суток после ТГГ) в поле CA1 гиппокампа. Возможно, что усиление процесса аутофагии, обнаруженное после действия ТГГ, связано с адаптивными механизмами, активируемыми в нейронах и направленными на утилизацию поврежденных органелл и белков.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-01152.

И.Ф. Шайдulloв, А.Ш. Гайфуллина,
Е.В. Ермакова, Г.Ф. Ситдикова

**РОЛЬ МЕТАБОЛИТА ЭТАНОЛА — УКСУСНОЙ
КИСЛОТЫ В АКТИВАЦИИ ВК-КАНАЛОВ
GH3 КЛЕТОК ГИПОФИЗА КРЫСЫ**

*Казанский федеральный университет, Казань,
Россия*

I.F. Shaidullov, A.S. Gaifullina,
E.V. Ermakova, G.F. Sitdikova

**THE ROLE OF ETHANOL METABOLITE — ACETIC
ACID IN ACTIVATION OF VK-CHANNELS OF RAT
GH3 PITUITARY TUMOR CELLS**

Kazan Federal University, Kazan, Russia

ilnarshaidullov@gmail.com

Этанол, а также его метаболиты, такие как ацетальдегид, могут оказывать различное воздействие на организм, начиная от хорошо известных поведенческих реакций до токсических, обладают нейродегенеративными или канцерогенными свойствами. Показано, что ацетальдегид участвует в модуляции ионных каналов, ингибирует активацию Ca-активируемых K-каналов большой проводимости (VK-каналов), регулирующие артериальное давление, секрецию гормонов или высвобождение медиатора. При этом ацетальдегид недолговечен и быстро распадается на менее токсичное соединение уксусную кислоту, роль которого в эффектах этанола в ЦНС остается неизвестной. Таким образом, целью нашей работы было исследовать влияние уксусной кислоты на VK-каналы.

Эксперименты проводились на культуре GH3 клеток гипофиза крысы, которые использовались для пэч-кламп регистрации активности VK-каналов. Регистрация параметров мембранного потенциала и выходящих K-токов GH3 клеток производилась в режиме «целая клетка», в котором ионные токи вызывались в ответ на серии деполяризующих импульсов с шагом 20 мВ от -80 мВ до +140 мВ. Соотношения тока (I-V) были построены на основе измерений амплитуд в конце тестовых импульсов.

Дозозависимая аппликация уксусной кислоты в концентрациях 0.005%, 0.01 и 0.02% приводила к гиперполяризации потенциала покоя мембраны с -44.96 ± 3.71 мВ до -64.52 ± 1.46 мВ в течение 1 мин ($n=4$, $p<0.05$), а также вызывало значительное увеличение амплитуды выходящих K-токов для всех используемых концентраций. Этот эффект был полностью предотвращен после применения специфического блокатора VK-каналов паксиллина в концентрации 1 мкМ, который вызывал сильное ингибирование выходящих токов. Кроме того, при регистрации одиночных каналов уксусная кислота в концентрации 0.02% значительно увеличивала вероятность открытия VK-каналов.

Таким образом, нами было показано, что один из продуктов метаболизма этанола — уксусная кислота — имеет свои собственные эффекты на активность VK-каналов и может оказывать вклад в угнетающее действие этанола на нейрональные функции через активацию VK-каналов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90084.

И.Г. Шалагинова¹, О.П. Тучина¹, М.В. Сидорова¹,
А.И. Вайдо², Н.А. Дюжикова²

**ВЫРАЖЕННОСТЬ ПОСТСТРЕССОРНОГО
НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ
УРОВНЕМ ВОЗБУДИМОСТИ НЕРВНОЙ
СИСТЕМЫ**

*¹ Балтийский федеральный университет имени
Иммануила Канта, Калининград, Россия*

*² Институт физиологии имени И.П. Павлова
Российской Академии наук, Санкт-Петербург,
Россия*

I.G. Shalaginova¹, O.P. Tuchina¹, M.V. Sydorova¹,
A.I. Vajdo², N.A. Dyuzhikova²

**SEVERITY OF POSTSTRESS
NEUROINFLAMMATION IN RATS WITH
DIFFERENT LEVELS OF EXCITABILITY OF THE
NERVOUS SYSTEM**

*¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad,
Russia*

*² Pavlov Institute of Physiology of the RAS, Saint
Petersburg, Russia*

shalaginova_i@mail.ru

Невротические, связанные со стрессом расстройства являются одними из самых распространенных непсихических патологий в России и мире. К заболеваниям этой группы относят фобии, паническое расстройство, посттравматическое стрессовое расстройство, обсессивно-компульсивное расстройство и ряд других, перечисленных в международной классификации болезней (МКБ–10).

Патогенез данных расстройств остается не выясненным, отсутствуют объективные биологические маркеры. Есть доказательства наличия признаков нейровоспаления (повышенная продукция провоспалительных цитокинов, активация микроглиальных клеток) как у пациентов с постстрессорными патологиями, так и у животных, подвергавшихся острому и хроническому стрессу. Выяснение роли генетически детерминированных особенностей ЦНС в генезе подобных постстрессорных нарушений иммунорегуляции — актуальная задача для биологических исследований.

Цель данной работы: оценить выраженность нейровоспаления в модели постстрессорной патологии у двух линий крыс, различающихся по уровню возбудимости нервной системы.

Эксперименты выполнены на взрослых самцах крыс с высоким и низким порогом возбудимости ($n = 66$). Линии крыс, прошедшие длительную селекцию по высокому и низкому порогу возбудимости нервной системы, являются уникальной моделью для изучения влияния психоэмоционального стресса на формирование постстрессорных патологических состояний. Подобные исследования позволят оценить вклад индивидуальной изменчивости по возбудимости нервной системы в эти процессы.

Две контрольные группы крыс (одна с высоким «ВП», другая с низким «НП» порогом возбудимости) содержались в стандартных условиях. Две экспериментальные группы (НП и ВП) подвергались длительному эмоционально-болевному стрессорному воздействию по Гехту. Для оценки уровня нейровоспаления фронтальные срезы головного мозга (префронтальная кора, гиппокамп и миндалина) окрашивали с использованием микроглиального маркера Iba1.

Выявлена связь генетически детерминированной возбудимости нервной системы с выраженностью пост-стрессорного нейровоспаления. Обсуждаются возможные механизмы такой взаимосвязи.

В.И. Шахматова, А.В. Яковлев, Г.Ф. Ситдикова
РАЗВИТИЕ КОРТИКАЛЬНОЙ ДЕПРЕССИИ
В СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЕ КРЫС
В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

V.I. Shakhmatova, A.V. Yakovlev, G.F. Sitdikova
DEVELOPMENT OF CORTICAL SPREADING
DEPRESSION IN SOMATOSENSORY CORTEX
AFTER PRENATAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA

Kazan Federal University, Kazan, Russia

matildadisk@gmail.com

Гомоцистеин — серосодержащая аминокислота, в высоких концентрациях обладающая нейротоксическими эффектами. Гипергомоцистеинемия (гГЦ) — повышенный уровень гомоцистеина в организме возникающий в результате нарушения работы ферментов, дефицит витаминов группы В, избыток метионина и нарушения выделительной функции. Показано, что гГЦ ведет к повреждению эндотелиальных клеток сосудов и повышает риск тромбозов, запускает нейровоспаление, вызывает увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера и как следствие, нейродегенерацию. Предполагается, что повышение уровня гомоцистеина может являться фактором риска возникновения мигрени. Центральным триггером болевой импульсации является кортикальная распространяющаяся депрессия (РКД), лежащая в основе мигрени с аурой, частота возникновения которой

ассоциируется с гГЦ. Целью настоящего исследования является анализ развития кортикальной депрессии с пренатальной гипергомоцистеинемией.

Эксперименты проводились на таламокортикальных срезах мозга крыс в возрасте P17-P28 (P0 — день рождения). РКД регистрировалась в 4 слое соматосенсорной коры при помощи внеклеточного электрода и вызывалась аппликацией 25 мМ KCl в течении 5 минут. Групповые данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка.

Анализ экспериментальных данных показал, что в контрольных условиях аппликация высокой концентрации ионов калия сопровождалась сдвигом постоянного тока через 1.5 ± 0.07 мин ($n=10$). Амплитуда и длительность РКД в контрольной группе составили 3.7 ± 1.2 мВ и 0.5 ± 0.2 мин ($n=10$), соответственно. Предварительная инкубация таламокортикальных срезов в гомоцистеин-тиолактоне (100 мкМ, 60 мин), а также, регистрация РКД в срезах, полученных от животных с пренатальной гипергомоцистеинемией, выявили снижение латентного периода до 1.1 ± 0.02 и 0.7 ± 0.2 мин ($n=13$, $p < 0.05$), соответственно. Также, наблюдалось увеличение амплитуды РКД до 5.2 ± 0.7 мВ ($n=21$; $p < 0.05$) в экспериментальной группе животных. Вероятность возникновения РКД в условиях острой инкубации гомоцистеин-тиолактона, а также в срезах животных с пренатальной гипергомоцистеинемией достоверно возросла с 70% до 91% (13 срезов из 14) и 79% (21 срез из 26), соответственно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о повышенной чувствительности нейронов соматосенсорной коры крыс к развитию кортикальной распространяющейся депрессии в условиях пренатальной гипергомоцистеинемии.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 18-015-00423.

14 ОКТЯБРЯ 2020

КЛЕТОЧНАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

М.Е. Белоконов¹, Н.А. Бородин¹,
В.Р. Хабибулина², М.С. Мелехин^{1,2}

СОСУЩАЯ ИНФУЗОРИЯ *OPHRYODENDRON ABIIETINUM*. МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ, НОВЫЕ СВЕДЕНИЯ О ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ

¹ Санкт-Петербургский Государственный
Университет, биологический факультет

² Зоологический Институт Российской Академии
Наук, лаборатория клеточной и молекулярной
протистологии

M.E. Belokon¹, N.A. Borodin¹,
V.R. Khabibulina², M.S. Melekhin^{1,2}

SUCTORIAN CILIATE *OPHRYODENDRON ABIIETINUM*. MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS, THE NEW INSIGHT ON THE LIFE CYCLE

¹ Saint Petersburg University, Faculty of Biology

² Zoological Institute, Russian Academy of Sciences,
Laboratory of Cell and Molecular Protistology

melehin-2010@yandex.ru

Инфузории рода *Ophryodendron* (Ciliophora: Phyllopharyngea) являются эпibiонтами различных морских беспозвоночных. В летние сезоны 2018–2019 гг в Белом море на колониях гидроидного полипа *Obelia longissima* нами был впервые найден один из представителей этого рода — *Ophryodendron abiietinum*.

Первое описание данного вида было сделано в 1885 году (Claparède and Lachmann, 1885). В 1909 году Мартин (Martin, 1909) обобщил имеющиеся данные об особенностях морфологии, питания и жизненного цикла инфузории. Было установлено, что в жизненном цикле *O. abiietinum* существует две стадии: «грушевидная», обладающая ловчим аппаратом, и «червеобразная», которая не имеет такой структуры. При анализе фиксированного материала нами была найдена вероятная переходная стадия от «червеобразной» к «грушевидной», о чем свидетельствует наличие у нее зачатка ловчего аппарата.

Помимо светооптических наблюдений на фиксированном материале, нами было проведено окрашивание ядерных структур по методу Фельгена, в результате которого в цитоплазме было обнаружено большое количество фельген-позитивных структур диаметром около 2,8 мкм. Число этих структур варьировало в разных клетках. По-видимому, большая часть этих структур представлена непереваженными ядрами клеток полипа *O. longissima*. Форма макронуклеусов менялась в зависимости от стадии: у «грушевидной» макронуклеус имел Y-образную форму, в то время как у «червеобразной» вытягивался вдоль продольной оси клеток и не нес отростков.

Филогенетическое положение рода *Ophryodendron* до настоящего момента не было установлено. Нами был проведен анализ последовательностей гена 18S рДНК *O. abiietinum* и других представителей п/кл Suctorina, взятых из базы данных GenBank. В результате филогенетических построений было показано, что *O. abiietinum*

формирует отдельную кладу в пределах подкласса, филогенетическое расстояние между ней и представителями двух других отрядов — Evaginogenina и Exogenina — измеримо с таковым между представителями двух разных отрядов п/кл Suctorina. Таким образом, система п/кл Suctorina, предложенная ранее Линном (Lynn, 2008), в рамках которой три отряда выделялись на основе разных моделей формирования бродяжек, по-видимому, требует пересмотра.

Проведенное исследование дополнило имеющиеся данные о морфологических особенностях и жизненном цикле *O. abiietinum* на основе световой и сканирующей электронной микроскопии. Впервые было охарактеризовано филогенетическое положение представителя этого рода.

Работа выполнена с использованием оборудования РЦ СПбГУ «Культивирование микроорганизмов» и ЦКП «Таксон» ЗИН РАН.

Литература:

1. Edouard Jean Louis R.A. Claparède, [Karl Friedrich] Johann Lachmann (1858): Reproduction des acinétiens. (*Ophryodendron abiietinum*) — Mém. Inst. natn. génev. —: 143–148.
2. Martin C. H., B.A. (1909): Some Observations on Acinetaria. Part 3.—The Dimorphism of *Ophryodendron*: 629–661.

М.А. Бердиева, И.А. Поздняков, В.О. Калинина ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С СИНГАМИЕЙ И МЕЙЗОМ, В ТРАНСКРИПТОМЕ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ *PROROCENTRUM MINIMUM*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

M.A. Berdieva, I.A. Pozdnyakov, V.O. Kalinina SYNGAMY- AND MEIOSIS-ASSOCIATED PROTEINS IN THE DINOFLAGELLATE *PROROCENTRUM MINIMUM* TRANSCRIPTOME

Institute of Cytology RAS, St-Petersburg, Russia

maria.berd4@yandex.ru

Динофлагелляты — одноклеточные эукариоты, населяющие водные, в первую очередь, морские экосистемы, от арктических до тропических широт. Эти организмы обладают рядом уникальных особенностей структурной организации их клеток и физиологии. В соответствии с современными представлениями они также могут иметь сложный жизненный цикл. В ходе исследований жизненного цикла динофлагеллят *Prorocentrum minimum* в условиях лабораторной культуры нами были описаны стадии полового процесса для этого организма.

Наличие белкового аппарата, обеспечивающего различные этапы сингамии (слияния гамет) и мейоза, также рассматривается как один из признаков, которые свидетельствуют в пользу наличия полового процесса у исследуемого организма. Одним из инструментов такого анализа является поиск аминокислотных последовательностей,

гомологичных белкам, изученным у модельных организмов. В настоящей работе были использованы неаннотированные транслированные транскрипты *P. minimum* CCMP1329 и CCMP2233 из базы данных проекта «Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project». В качестве последовательностей запроса использовали аминокислотные последовательности представителей высших растений, дрожжей и альвеолят из базы данных белковых последовательностей National Center for Biotechnology Information или геномной базы данных *Saccharomyces Genome Database*. Поиск гомологичных последовательностей проводили с помощью алгоритма BLASTP. Учитывали только те результаты, для которых статистический параметр *e-value* не превышал $1e-10$. Далее отобранные последовательности *P. minimum* использовали в качестве запроса для поиска соответствия в избыточной базе данных белковых последовательностей NCBI с использованием алгоритма BLASTP. Наличие консервативных доменов и мотивов в аминокислотных последовательностях проверяли с использованием инструмента CD-Search. В результате были отобраны только те последовательности *P. minimum*, которые прошли все этапы проверки.

Проведенный анализ транскриптомов *P. minimum* выявил аминокислотные последовательности, представляющие собой гомологи белка HAP2, который экспрессируется в гаметах и участвует в слиянии клеточных мембран. Также были обнаружены гомологи ряда белков, обеспечивающих различные этапы мейоза. Согласно полученным данным этот вид динофлагеллят обладает структурными белками-элементами когезинового комплекса, компонентами аппарата процессинга двухцепочечных разрывов, белком-переносчиком односторонних концов ДНК между рекомбинирующими молекулами и участниками событий, приводящих к кроссинговеру, ферментами репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, некоторыми регуляторными белками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-34-00907).

С.С. Бутенко^{1,2}, Д.М. Есюнина¹, М.А. Простова¹
ИССЛЕДОВАНИЕ КОРОТКИХ БЕЛКОВ-АРГОНАВТОВ ПРОКАРИОТ

¹ Институт Молекулярной Генетики РАН, Москва, Россия

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

S.S. Butenko^{1,2}, D.M. Eshynina¹, M.A. Prostova¹
RESEARCH OF SHORT PROKARYOTIC ARGONAUTE PROTEINS

¹ Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

butenkonew@gmail.com

Белки-аргонавы эукариот играют ключевую роль в процессе РНК-интерференции. В комплексе с некодирующими РНК они регулируют экспрессию генов, а также способны подавлять активность мобильных генетических элементов. В отличие от белков-аргонавтов

эукариот, о прокариотических белках-аргонавах известно очень мало.

Белки-аргонавы прокариот значительно более разнообразны, чем белки-аргонавы эукариот по строению и функциям. Так называемые короткие белки-аргонавы не содержат N- и PAZ- доменов. PAZ-домен ответствен за взаимодействие с 3' концом направляющей нуклеиновой кислоты, а N-домен облегчает расплетание РНК-дуплекса во время загрузки гида в эукариотические аргонавы. Также короткие аргонавы каталитически неактивны, так как не содержат ключевых каталитических остатков в PIV1-домене. Исследования геномов прокариот показали, что такие белки-аргонавы могут быть ассоциированы с белками с предсказанной нуклеазной активностью, которая может компенсировать отсутствие нуклеазной активности самого аргонава.

В нашей работе впервые начаты исследования короткого бактериального белка-аргонава и ассоциированной с ним нуклеазы из мезофильной азотфиксирующей бактерии. Созданы плазмиды для экспрессии белка-аргонава, ассоциированной с ним нуклеазы и их совместной экспрессии в *E.coli*. Подобраны условия экспрессии и очистки этих белков. В настоящее время проводится ряд экспериментов для установления природы ассоциированных с аргонавом нуклеиновых кислот, а также проверки активности комплекса белка-аргонава и ассоциированной с ним нуклеазы *in vitro*. Эти исследования позволят в дальнейшем ответить на вопрос о функциях короткого белка-аргонава и ассоциированной с ним нуклеазы в клетке хозяина.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 18-29-07086-мк.

Е.Н. Волкова¹, А.А. Кудрявцев^{1,2}

МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ АМЕБ NEOPARAMOEBA, PARAMOEBA (AMOEBOZOA, DACTYLOPODIDA), JANICKINA (INCERTAE SEDIS) И ИХ СИМБИОНТА PERKINSELA-ПОДОБНОГО ОРГАНИЗМА

¹ Лаборатория Клеточной и Молекулярной Протистологии, ЗИН РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Кафедра Зоологии Беспозвоночных, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

E.N. Volkova¹, A.A. Kudryavtsev^{1,2}

MOLECULAR-PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF NEOPARAMOEBA, PARAMOEBA (AMOEBOZOA, DACTYLOPODIDA), JANICKINA (INCERTAE SEDIS) AND THEIR SYMBIONT PERKINSELA-LIKE ORGANISM

¹ Laboratory of Cellular and Molecular Protistology, ZIN, RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Department of Invertebrate Zoology, SPbSU, Saint-Peterburg, Russia

arcellinidae@gmail.com

Neoparamoeba и *Paramoeba* — морские и эстуарные амёбы, содержащие внутриклеточный кинетопластидный симбионт, *Perkinsela*-подобный организм (PLO). Некоторые представители рода *Neoparamoeba* способны переходить к паразитированию на промысловых видах рыб и морских беспозвоночных, в то время как амёбы рода *Paramoeba* известны как исключительно

свободноживущие организмы. Наличие у простейших такого эукариотического нефотосинтезирующего внутриклеточного кинетопластидного симбионта как PLO — явление уникальное, характерное только для амёб родов *Neoparamoeba* и *Paramoeba*. Более того, долгое время считалось, что присутствие в клетке PLO — таксономический признак, позволяющий отличить неопарамеб и парамеб от близкого им рода *Korotnevella*. Помимо *Neoparamoeba* и *Paramoeba* существует два других вида амёб, содержащих PLO — *Janickina pigmentifera* и *Janickina chaetognathi*, известные как паразиты морских беспозвоночных — щетинкочелюстных (Chaetognatha). Из литературы известно, что морфология *Janickina* крайне необычна для других Amoebozoa. Последнее исследование *Janickina* было сделано 40 лет назад, и тогда же роду был присвоен статус *incertae sedis*; молекулярно-филогенетических данных ни о самой амёбе, ни об её симбионте с тех пор не появилось. *Janickina* по-прежнему не изучена на современных светооптическом и молекулярном уровнях. Наше исследование направлено на изучение, в первую очередь, филогенетических взаимоотношений *Neoparamoeba*, *Paramoeba*, *Janickina* и их симбионтов PLO. Мы представляем новые данные к сравнению эволюционных сценариев симбионта и хозяина, которые противоречат полученным ранее представлениям о коэволюции в данной группе. Нами впервые отмечен факт, по-видимому, вторичной утраты симбионта у представителей рода *Paramoeba*. Мы также получили первые молекулярно-филогенетические данные для *Janickina pigmentifera* и её симбионта, позволяющие сделать вывод о филогенетическом положении этого вида в системе Amoebozoa.

Работа выполнена в рамках темы госзадания АААА-А19-119031200042-9 и частично поддержана грантом РФФИ 18-34-00726-мол_а.

А.В. Герцен¹, К.П. Чаленко¹, Д.Д. Недорезова¹,
Д.М. Колпашиков^{1,2}, Е.И. Кошель¹

РАЗРАБОТКА СТРАТЕГИИ БОРЬБЫ С АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫМИ ШТАММАМИ БАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДНК — НАНОМАШИН

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² Университет Центральной Флориды, Орландо, США

A.V. Gertsen¹, K.P. Chalenko¹, D.D. Nedorezova¹,
D.M. Kolpashnikov^{1,2}, E.I. Koshel¹

DEVELOPMENT OF A STRATEGY TO COMBAT ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS OF BACTERIA BASED ON THE USE OF DNA — NANOMACHINES

¹ ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

² University of Central Florida, Orlando, USA

gertsen@scamt-itmo.ru

Антибиотикорезистентность является одной из самых опасных угроз для человечества в современной международной системе здравоохранения. По некоторым оценкам, к 2050 году ежегодно 10 миллионов человек будут умирать из-за отсутствия эффективного лечения бактериальных инфекций [1]. Поскольку бактерии вырабатывают устойчивость к антибиотикам быстрее,

чем новые лекарства выходят на рынок, существует потребность в появлении новых подходов к решению этой проблемы.

Настоящая работа посвящена изучению возможности использования ДНК-наномашин на основе дезоксирибозимов (Дз) в качестве антимикробных агентов направленного действия. Дз представляет собой одноцепочечную молекулу ДНК, способную к специфическому узнаванию и разрезанию РНК молекул. В качестве модельного организма был выбран штамм *E. coli* CC118 со встроенной кассетой устойчивости к стрептомицину (SmR), находящейся на плазмиде pKNG 101. Для проведения *in vitro* экспериментов синтезирован 47-нуклеотидный РНК субстрат, соответствующий участку кассеты антибиотикорезистентности. Дз был сконструирован для узнавания определенного G-U сайта в пределах этого участка. Для увеличения каталитической активности на основе Дз разработана ДНК — наномашина (НМ). В ее составе помимо Дз присутствуют дополнительные участки связывания с РНК, обуславливающие увеличение расплетающей способности вторичной структуры субстрата.

Дз и соответствующая ему НМ были протестированы в 15% полиакриламидном гель-электрофорезе. Для этого исследуемые ДНК — структуры инкубировались на протяжении суток с РНК субстратом с контролем временных точек. Максимально достигнутая каталитическая активность составила 56% для НМ по истечении 24 часов.

Для проверки эффективности ДНК — структур на бактериальной культуре клеток разработан дизайн модифицированной НМ, в которой некоторые связи между нуклеотидами, за исключением участка каталитического ядра, были заменены с фосфодизэфирных на фосфоротиоатные. Такая модификация должна помочь противостоять воздействию рестриктаз [2] внутри клетки.

Дз представляют собой перспективный инструмент для борьбы с устойчивостью к антибиотикам среди резистентных штаммов. На данный момент уже показана эффективность Дз в отношении некоторых микроорганизмов и вирусов [3]. Поскольку Дз по своей природе являются нуклеиновыми кислотами, они не обладают выраженной токсичностью и могут стать альтернативой применению антибиотиков.

Литература:

- de Kraker M. E. A., Stewardson A. J., Harbarth S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? // PLoS medicine. — 2016. — Т. 13. — №. 11.
- Schubert S. et al. RNA cleaving '10–23'DNAzymes with enhanced stability and activity // Nucleic acids research. — 2003. — Т. 31. — №. 20. — С. 5982–5992.
- Baum D. A., Silverman S.K. Deoxyribozymes: useful DNA catalysts in vitro and in vivo // Cellular and molecular life sciences. — 2008. — Т. 65. — №. 14. — С. 2156–2174.

А.Б. Гринев, Н.Ю. Фокина

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗОЛЯТОВ *PLASMODIUM FALCIPARUM*, ВЫДЕЛЕННЫХ В ГЕОГРАФИЧЕСКИ УДАЛЕННЫХ РЕГИОНАХ

ФГАОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава РФ, Москва, Россия

A.B. Grinev, N.Yu. Fokina

GENOME-WIDE COMPARATIVE ANALYSIS OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* ISOLATES FROM GEOGRAPHICALLY DISPERSED REGIONS

Sechenov First Moscow State Medical University,
Moscow, Russia

retrospector@ispras.ru

Одним из наиболее важных протозоозов является тропическая малярия. Высокая скорость возникновения эволюционных преобразований у паразита и тяжелые осложнения делают это заболевание социально значимым. Несмотря на большое количество исследований, посвященных генетической диверсификации внутри вида *P. falciparum*, не до конца выяснена разница между географически разобщенными изолятами.

В рамках настоящей работы были проанализированы геномы 4 изолятов *P. falciparum* (в культуре), имеющие различное географическое происхождение: 7G8 (Бразилия), GB4 (Гана), Dd2 (Лаос) и HB3 (Гондурас) [1, 2]; использованы сиквенсы, размещенные в базе данных PlasmoDB [3]. Анализ проводился похромосомно, для хромосом 1–14, геномов апиколаста и митохондрии, путем попарного локального выравнивания геномов различных изолятов с помощью инструмента NUCmer, входящего в состав пакета MUMmer (версия 4.0.0beta2) [4]. Геномы сравнивались путем выявления хромосомных перестроек: инсерций, делеций, инверсий.

Получены следующие результаты:

- Наибольшим сходством обладают геномы изолятов 7G8 и GB4 (9 перестроек), наименьшим — GB4 и HB3 (16 перестроек). В среднем значение сходства оценивается в 13.75 перестроек. Между геномами изолятов 7G8 и HB3 имеется большое количество различий — 15 перестроек — несмотря на то, что оба из них происходят из стран Латинской Америки.
- Инверсии составляют наибольшую долю от хромосомных перестроек — в среднем 66% различий между геномами двух изолятов; остальные 34% приходятся на инсерции и делеции.
- Как правило, инверсии локализованы вблизи концов хромосомы: 62% — 5` конца, 24% — 3` конца. На расстоянии более 100 т.п.н. от концов хромосомы расположены лишь 14% инверсий.
- Инсерции и делеции, наоборот, расположены преимущественно в центральной части хромосомы — они удалены от ее концов не менее чем на 150 т.п.н.

География происхождения изолятов и сходство их геномов демонстрируют отрицательную корреляцию.

Литература:

1. Origin of some *P. falciparum* strains. URL: <https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/parasitology/eng/Strain1.htm>.
2. Theron M., Cross N., Cawkill P. et al. An in vitro erythrocyte preference essay reveals that *Plasmodium falciparum* parasites prefer Type O over Type A erythrocytes. Sci. Rep. 2018; 8.

3. PlasmoDB. Release 46. URL: <https://plasmodb.org/plasmo/>.
4. Marçais G., Delcher A., Phillippy A. et al. MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. PLOS Comp. Biol. 2018; 14.

А.Н. Гринько, В.Ю. Филина, Е.В. Ермилова

ФУНКЦИИ УСЕЧЕННЫХ ГЕМОГЛОБИНОВ 1 И 2 ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

A.N. Grinko, V.Yu. Filina, E.V. Ermilova.

FUNCTIONS OF TRUNCATED HEMOGLOBINS 1 AND 2 OF THE UNICELLULAR GREEN ALGA *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg,
Russia

st047636@student.spbu.ru

Усеченные гемоглобины (trHbs) составляют широко распространенное семейство белков, которые выявлены в клетках архей, бактерий и эукариот. trHbs представляют собой подсемейство гемоглобинов, формирующих 2-на-2 спиральный сэндвич (вместо классического 3-на-3 спирального сэндвича), в котором две альфа-спирали расположены над двумя другими альфа-спиралями. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что trHbs, помимо участия в переносе кислорода, могут выполнять и другие функции, которые в основном остаются неизвестными. Чтобы выяснить функции trHb, необходимо охарактеризовать условия, в которых увеличивается экспрессия этих глобиновых белков и исследовать механизмы их регуляции. Нами была проанализирована транскрипция генов trHb (*THB1–12*) у *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях голодания по фосфору (P). Три гена *THB*, *THB1*, *THB2* и *THB12* индуцировались при удалении P из среды. По нашим данным в условиях недостатка P клетки генерируют окись азота (NO) и ее формирование не зависит от системы нитратредуктазы — NO-формирующая нитритредуктаза. Чтобы выяснить функции *THB1* и *THB2*, с помощью метода экспрессии искусственных микроРНК были получены штаммы со сниженными уровнями *THB1* и *THB2*. Редукция синтеза обоих *THB* привела к уменьшению размеров клеток и снижению уровней хлорофилла в трансформантах. Кроме того, полученные нами данные свидетельствуют о том, что *THB1* или *THB2* вовлечены в модуляцию уровня NO в условиях фосфорного голодания. Полученные данные предполагают, что *THB1* и *THB2* представляют собой компоненты общего стрессового ответа одноклеточной водоросли.

Работа поддержана грантом РФФ № 16-14-1000-П.

Литература:

1. Valentina Filina, Alexandra Grinko and Elena Ermilova. Truncated hemoglobins 1 and 2 are implicated in the modulation of phosphorus deficiency-induced nitric oxide levels in *Chlamydomonas*. Cells 2019, 8, 947; doi:10.3390/cells8090947.

Е.И. Гулк, Е.Б. Замяткина,
В.С. Лемешева, Е.Р. Тараховская

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ НА МЕТАБОЛИЗМ *EUGLENA GRACILIS*

Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург Россия

E.I. Gulk, E.B. Zamyatkina, V.S. Lemesheva,
E.R. Tarakhovskaya

EFFECT OF EXOGENOUS ORGANIC SUBSTRATES ON THE METABOLISM OF *EUGLENA GRACILIS*

Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg,
Russia

kategulk@gmail.com

Одноклеточная водоросль *Euglena gracilis* Klebs. является миксотрофным организмом, характеризующимся высокой метаболической пластичностью. В дополнение к фототрофному питанию, эвглена способна усваивать широкий спектр органических субстратов: сахара, спирты, органические кислоты, аминокислоты и др. Присутствие источников органического углерода приводит к существенным перестройкам метаболизма эвглены. Целью данной работы является исследование роста культур и метаболизма клеток *E. gracilis* в присутствии органических субстратов разной химической природы.

Водоросли культивировались на среде Crater-Muysers (25 °C, 50 µM/м²с) автотрофно (контроль) или в присутствии субстратов (этанол, глюкоза, галактоза, бутанол, глицин, гликолевая кислота, глицерин). Культура доводилась до начала фазы экспоненциального роста (4 суток), после чего оценивались количество и биохимический состав клеток.

Культура эвглены достигала наибольшей плотности в присутствии этанола и глюкозы (соответственно, в 2 и 3 раза выше контроля). При этом в клетках активно накапливался парамилон (запасной полисахарид) и снижалось содержание фотосинтетических пигментов. Этот эффект был особенно выражен в клетках, растущих в присутствии этанола — содержание парамилона в них было на порядок выше (до 1 нг на клетку), а содержание хлорофилла «а» — в 4 раза ниже, чем в контроле. В присутствии бутанола и глицерина рост культуры замедлялся (соответственно, в 2 и 1.5 раза, по сравнению с контролем). Однако эти субстраты также стимулировали запасание парамилона и снижение содержания хлорофилла «а» в клетках. Остальные субстраты не оказали достоверного влияния на скорость деления клеток эвглены. При этом клетки, выращенные в присутствии гликолевой кислоты и глицина, содержали в 2.5 раза больше парамилона, чем клетки контрольного варианта. Галактоза не оказала значимого эффекта на содержание парамилона в клетках эвглены, однако стимулировала синтез хлорофилла «а» и каротиноидов.

По-видимому, *E. gracilis* использует разные «стратегии» усвоения экзогенных органических субстратов, в зависимости от их химической природы. Предпочтительными субстратами являются этанол и глюкоза, при этом в первом случае дополнительный углерод преимущественно используется в реакциях глюконеогенеза и запасается в клетке в форме парамилона, а во втором случае — расходуется на увеличение скорости деления клеток (т. е., на дыхание и синтез белка). При этом эвглены существенно подавляются фотосинтетические

процессы. Усвоение гликолевой кислоты и глицина, напротив, не сопровождается значимыми изменениями фотосинтетической активности. Эффективное усвоение бутанола и глицерина, по-видимому, требует наиболее значительных перестроек метаболизма клеток эвглены, что приводит к увеличению продолжительности лаг-фазы развития культуры.

Проект выполняется при поддержке РФФИ (грант № 20-04-00944).

В.А. Деркач, Ж.М. Залуцкая, Е.В. Ермилова

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ПРОЛИНА ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРΟΣЛЮ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

**V.A. Derkach, Zh.M. Zalutskaya, E.V. Ermilova
REGULATION OF PROLINE BIOSYNTHESIS IN UNICELLULAR GREEN ALGAE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* UNDER STRESS CONDITIONS**

Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia

derkachvita99@gmail.com

Многие организмы, включая фотосинтезирующие эукариотические микроорганизмы, используют в адаптации к действию различных по природе стрессоров органические молекулы, к которым относится и пролин. Установлено, что пролин накапливается в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях солевого стресса, выполняя функции осмолитика [1]. Однако вопрос о вовлечении пролина в адаптацию *C. reinhardtii* к другим стрессовым воздействиям ранее никем не изучался, и не были охарактеризованы возможные механизмы контроля его биосинтеза. У *C. reinhardtii* возможны два пути формирования пролина: (1) из глутамата и (2) из аргинина через орнитин. Следует подчеркнуть, что два первых этапа «глутаматного пути» у *C. reinhardtii* катализируются отдельными ферментами (глутамат-5-киназой и глутамат-5-полуальдегид дегидрогеназой), как это происходит у бактерий, и соответственно отличаются от растений, у которых обе реакции катализируются одним бифункциональным ферментом — пирролин-5-карбоксилатсинтетазой. В работе использовали метод количественной ПЦР, биохимические методы анализа белка и хлорофилла, а также газовую хроматографию, совмещенную с масс-спектрометрией. Полученные нами данные впервые указывают на то, что пролин используется клетками *C. reinhardtii* в качестве универсальной защитно-адаптивной молекулы при действии стрессоров различной природы, включая гипертермию и гипоксию, и во всех проанализированных случаях происходит значительная индукция гена *GGK1* (глутамат-5-киназа 1), который, по нашему мнению, может служить «геном-маркером» указанных стрессовых условий для *C. reinhardtii*. Т.о., контроль транскрипции вовлечен в регуляцию аккумуляции пролина в стрессовых условиях. На основе анализа полученных трансформантов со сниженными уровнями усеченного гемоглобина 2 и использования генератора окиси азота (DEA-NONOate) была подтверждена высказанная нами гипотеза о вовлечении NO в контроль аккумуляции пролина, и установлено, что регуляция

синтеза аминокислоты окисью азота, по крайней мере, частично, осуществляется на уровне транскрипции.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 16-14-1000-П.

Литература:

1. Mastrobuoni G., Irgang S., Pietzke M. *et al.* Proteome dynamics and early salt stress response of the photosynthetic organism *Chlamydomonas reinhardtii*. BMC Genomics. 2012; 13 (215). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-215>.

**В.В. Долгих, С.А. Тимофеев,
В.С. Журавлев, И.В. Сендерский**
**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ
ВЗАИМООТНОШЕНИЙ МИКРОСПОРИДИЙ
С ЗАРАЖЕННОЙ КЛЕТКОЙ ХОЗЯИНА
И БОРЬБЫ С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ
ПАЗАРИТАМИ**

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

V.V. Dolgikh, S.A. Timofeev,
V.S. Zhuravlyov, I.V. Senderskiy

**THE NEW METHODS OF ANALYSIS
OF MICROSPORIDIA RELATIONS WITH
INFECTED HOST CELL AND SUPPRESSION
OF INTRACELLULAR INFECTIONS**

*All-Russian Research Institute of Plant Protection,
Saint-Petersburg, Russia*

dol1slav@yahoo.com

Микроспоридии — широко распространенные, близкие к грибам облигатные внутриклеточные паразиты. Их глубокая зависимость от метаболической системы зараженной клетки хозяина, минимизация собственного функционального аппарата и генома определяют интерес к группе со стороны фундаментальной науки. Однако невозможность культивирования микроспоридий вне клетки хозяина сильно затрудняет их изучение с помощью молекулярных методов. В докладе будут рассмотрены современные подходы, используемые для анализа молекулярных аспектов взаимоотношений этих паразитов с зараженной клеткой хозяина, и представлены последние результаты этих исследований. Практическое значение микроспоридий обусловлено их важной ролью в качестве регуляторов численности в природных популяциях насекомых-фитофагов. Кроме того, микроспоридии являются опасными патогенами полезных видов животных и человека. Наибольшую известность среди таких патогенов приобрели высококовирулентные паразиты медоносной пчелы *Apis mellifera* и тутового шелкопряда (шелковичного червя) *Bombyx mori*. В докладе будут рассмотрены новые подходы, основанные на использовании методов РНК-интерференции и рекомбинантных scFv-антител, для борьбы с микроспоридиозами одомашненных насекомых и другими протозойными инфекциями. Особое внимание в докладе будет уделено исследованиям нашей группы, посвященным конструированию одноцепочечных scFv-антител, блокирующих транспорт АТФ из цитоплазмы хозяина в клетку паразита и перспективных для создания форм насекомых, устойчивых к микроспоридиозам.

Работа поддержана грантами РФФИ № 18-16-00054, РФФИ 15-04-04968, 18-34-00265мол_а.

В.С. Журавлев, С.А. Тимофеев, В.В. Долгих
**КОНСТРУИРОВАНИЕ И ОТБОР
РЕКОМБИНАНТНЫХ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ
АНТИТЕЛ К ГЕКСОКИНАЗЕ
МИКРОСПОРИДИИ NOSEMA BOMBYCIS**

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

V.S. Zhuravlyov, S.A. Timofeev, V.V. Dolgikh
**CONSTRUCTING AND SELECTION
OF RECOMBINANT SINGLE-CHAIN ANTIBODIES
TO HEXOKINASE OF THE MICROSPORIDIUM
NOSEMA BOMBYCIS**

*All-Russian Research Institute of Plant Protection,
Saint-Petersburg, Russia*

v.guravlev@hotmail.com

Гексокиназа — ключевой фермент углеводного обмена, осуществляющий фосфорилирование гексоз и запускающий анаэробное расщепление глюкозы в ходе гликолиза. Гексокиназа внутриклеточных паразитических микроорганизмов, относящихся к типу Microsporidia обладает уникальными свойствами, предполагающими ее активное участие в регуляции транскрипционной активности генов хозяина: (1) сохранение в геноме паразитов при утрате других компонентов гликолиза, (2) экспрессия уже на ранних этапах внутриклеточного развития микроспоридий, (3) интенсивная секреция в цитоплазму хозяина, (4) накопление в ядрах зараженных клеток.

Гетерологичная экспрессия гексокиназы микроспоридии *Nosema bombycis* (высоковирулентного паразита шелковичного червя *Bombyx mori*) с использованием вектора pOPE101 и бактериального штамма *Escherichia coli* XL-1Blue MRF⁺ позволила получить очищенный фермент в активной конформации, кинетические характеристики которого были сопоставимы с таковыми у других организмов. Очищенный фермент микроспоридий был использован для конструирования иммунной библиотеки рекомбинантных одноцепочечных антител (scFv-фрагментов) и отбора вариантов, специфичных к нативной форме гексокиназы. Конструирование иммунной библиотеки осуществлялось с использованием РНК, выделенной из селезенки предварительно иммунизированных мышей с последующим синтезом кДНК и ПЦР-амплификацией всех возможных вариантов генов переменных доменов тяжелых (VH) и легких (VL) цепей IgG. Полученный репертуар генов VH/VL-фрагментов был клонирован в фагемидный вектор pSEX81. Разнообразие конечной библиотеки после трансформации штамма *E. coli* XL-1Blue MRF⁺ полученными конструкциями составило около 5 млн индивидуальных клонов. Для отбора специфичных антител была использована технология фагового дисплея, основанная на том, что бактериофаги M13, несущие различные варианты сконструированных фагемид, экспонируют кодируемые ими scFv-антитела на своей поверхности. После проведения двух раундов селекции бактериофагов, несущих антитела против иммобилизованной гексокиназы, отобранные гены были переклонированы в экспрессирующий вектор pOPE101 для последующей наработки scFv-молекул в *E. coli*. Анализ scFv-фрагментов, продуцируемых

двумя сотнями бактерий-трансформантов, позволил уже на данном этапе отобрать три варианта антител с разной антиген-связывающей активностью. Идентичность их аминокислотных последовательностей составила 33–50%. Внутри двух групп scFv-антител была обнаружена внутренняя гетерогенность (2 и 5 вариантов, соответственно, с идентичностью 93–94%). Полученные антитела позволяют перейти к работе по оценке их способности ингибировать активность гексокиназы, нарушать ее транспорт в ядро клетки-хозяина и подавлять внутриклеточное развитие микроспоридии *N. bombocis*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-16-00054.

**С.В. Иванова, Т.Г. Шапошникова,
К.А. Бенкен, Е.В. Сабанеева**

ВЫЯВЛЕНИЕ АКТИНА, АССОЦИИРОВАННОГО С ЯДЕРНЫМ КОМПАРТМЕНТОМ ИНФУЗОРИЙ (CILIOPHORA)

Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

S.V. Ivanova, T.G. Shaposhnikova,
K.A. Benken, E.V. Sabaneyeva

VISUALIZATION OF ACTIN ASSOCIATED WITH NUCLEAR COMPARTMENT IN CILIATES

St-Petersburg State University, St-Petersburg, Russia

awdr893@mail.ru

Актиновый цитоскелет — это важнейший структурный компонент клетки, который встречается у всех эукариот. Актин является очень консервативным белком, представлен несколькими изоформами и выполняет в клетке множество функций. Актин и его гены хорошо изучены у млекопитающих, в отличие от представителей других таксонов, в частности, инфузорий, у которых актин намного более изменчив. Из-за отличий в аминокислотной последовательности и по ряду биохимических свойств, актин инфузорий часто называют «нетрадиционным». Эти отличия во многом объясняют сложность выявления, а в связи с этим и недостаточную изученность строения актинового цитоскелета инфузорий.

Работа посвящена разработке методов выявления актина у клонов инфузорий, относящихся к разным таксонам: *Sterkiella histriomuscorum* и *Stylonichia mytilus* (Spirotrichea), *Spirostomum ambiguum* (Heterotrichea), *Paramecium tetraurelia* (Oligohymenophorea). Клоны всех видов, за исключением клона *S. histriomuscorum*, чья видовая принадлежность была определена путем секвенирования гена 18S рРНК, были получены из коллекции культур RC ССМ Ресурсного Центра СПбГУ «Культивирование микроорганизмов». Обработка флуоресцентно меченным фаллоидином выделенных ядер продемонстрировала, что фибриллярный актин присутствует в ядрышках у всех исследованных видов, причем интенсивность флуоресценции зависит от размеров ядрышек. В репликационной полоске у обоих видов Spirotrichea флуоресценция отмечалась лишь в участках, непосредственно контактирующих с ядрышком. Повидимому, у всех исследованных видов фибриллярный актин принимает участие в организации пространственной структуры ядрышек и его функционировании, но не участвует в процессе репликации хроматина у Spirotrichea. Актин присутствовал также в области перемычки, соединяющей лопасти макронуклеуса у обоих видов *S. mytilus*

и *S. histriomuscorum*, однако в отсутствие специфичных антител к маркерам ядерной оболочки в настоящее время не представляется возможным установить, является ли этот актин ядерным.

Другим способом визуализации актина, позволяющим выявить как фибриллярный, так и глобулярный актин, является применение антител. Для проверки специфичности поликлональных антител к синтетическому пептиду, соответствующему С-концу изоформы актина 4-2 *P. tetraurelia*, для которой характерна внутриядерная локализация, был проведен электрофорез в полиакриламидном геле по Лэммли тотального белка инфузорий *S. ambiguum* и *P. tetraurelia* и Вестерн-блот. Установлено, что специфичные к актину 4-2 *P. tetraurelia* антитела выявляют полосу, соответствующую белку с молекулярной массой приблизительно равной 42 кДа, что позволит их в дальнейшем использовать при исследованиях содержащих актин структур у данных видов методами иммуноцитохимии и иммуноблота.

П.А. Иванов-Ростовцев

D-SELF МОДЕЛИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ РОСТА ДРОЖЖЕЙ SACCHAROMYCES CEREVISIAE ПРИ КОРРЕЛЯЦИИ АКТИВНОСТЕЙ УГЛЕКИСЛОТЫ И ГЛИКОГЕНА ГБОУ ОЦ «ПРОТОН», МОСКВА, РОССИЯ

P.A. Ivanov-Rostovtsev

D-SELF MODELING OF GROWTH STABILITY OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE YEAST UNDER CORRELATION OF CARBON DIOXIDE AND GLYCOGEN ACTIVITY

GBOU OC "Proton", Moscow, Russia

rostovtsevp@gmail.com

Введение. Фазы роста дрожжевой колонии традиционно описываются гладкой (почти постоянной) кривой эволюционирования. Нестационарности (возможно периодические) этих фаз, как правило, не учитываются. Целью данной работы является исследование возможных периодических режимов в жизнедеятельности колонии путем параллельного (корреляционного) измерения углекислого-газовой и гликогеновой активности в минутных и часовых временных диапазонах.

Материал и методы. 1) Для проведения эксперимента на пробирки с раствором (20–25 мл) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (1–2мл) и питательной смеси в виде глюкозы (16–18 мл) и азотно-фосфорным питанием (3–5 мл), надевались герметичные резиновые шарики. Пробирки помещались в термостат, и ежеминутно производились измерения объемов углекислоты в шариках. 2) В пробирках с тем же дрожжевым раствором ионометром измерялось внеклеточное pH по методу известного теста «силы подкисления», что являлось индикатором уровня гликогена в клетках. На основе серий измерений анализировались статистические данные. Корреляция нестационарностей углекислоты и гликогена наблюдалась в 70–85% случаев. 3) Для моделирования устойчивости роста дрожжей использовалась методика анализа саморегуляции периодических процессов — модель D-SELF [1]. Согласно модели, «всплески» и «спады» активностей углекислоты и гликогена в эксперименте должны были показывать закономерную динамику в сторону увеличения и уменьшения временных периодов

нестационарностей в зависимости от силы осмотического и температурного стрессов дрожжевых клеток [2].

Результаты экспериментов выявили граничные (предельные) концентрации исходной культуры дрожжей и состава питательной смеси. В диапазоне указанных концентраций наблюдалась относительно устойчивая динамика роста колонии. Нестационарные пульсации активности общей биохимической реакции роста носили квазипериодический характер. В отдельных часовых периодах наблюдалась устойчивая саморегуляция дрожжевой колонии в минутных диапазонах.

Выводы. Результаты моделирования могут быть использованы для анализа устойчивости колоний других микроорганизмов — бактерий и вирусов.

Литература:

1. G.M. Degtyarev et al. Space-time symmetry in open dynamic systems (D-SELF model). *Sov. Phys. Dokl.* 1990; 35(12): 1062–1064.
2. Balakumar S., Arasaratnam V. Osmo-, thermo- and ethanol-tolerances of *Saccharomyces cerevisiae* S1. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2012; 43(1): 157–166.

**В.О. Калинина, М.А. Бердиева,
Е.В. Ломерт, С.О. Скарлато**

ВЛИЯНИЕ НЕДОСТАТКА АЗОТА И ФОСФОРА НА ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ДИНОФЛАГЕЛЛ *PROROCENTRUM MINIMUM* (ДИНОФУСЕАЕ)

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

**V.O. Kalinina, M.A. Berdieva,
E.V. Lomert, S.O. Skarlato**

INFLUENCE OF NITROGEN AND PHOSPHORUS DEFICIENCY ON THE LIFE CYCLE OF THE DINOFLAGELLATE *PROROCENTRUM MINIMUM* (DINOPHYCEAE)

Institute of Cytology RAS, St-Petersburg, Russia

verakamakalinina@gmail.com

Азот (N) и фосфор (P) являются ключевыми биогенными элементами и необходимы для роста и развития динофлагелл. Недостаток этих элементов запускает механизмы, повышающую их ассимиляцию и вызывает приостановку клеточного цикла. Более того, для многих динофлагелл недостаток N и, особенно, P в среде, является стимулом к переходу от вегетативной стадии жизненного цикла к половой и образованию покоящихся цист. Считается, что динофлагеллы имеют гаплофазный жизненный цикл (исключение — *Noctiluca*). Однако, все больше появляется данных о том, что диплоидные зиготы могут делиться митозом и, следовательно, жизненный цикл динофлагелл можно считать гаплодиплофазным.

Половой процесс *Prorocentrum minimum* был показан нами в стареющей культуре (1–2 месяца культивирования без добавления свежей среды и питательных веществ). Целью данной работы было показать какие именно стимулы индуцируют появление и слияние гамет у этого вида динофлагелл. Логично предположить, что ими могут быть недостаток N и/или P в среде.

Клетки *P. minimum* ССАР1136/16 выращивались в стеклянных колбах в среде f/2. На экспоненциальной фазе роста (120000 кл*мл⁻¹) клетки были синхронизированы по фазам клеточного цикла и разбавлены свежей средой без добавления источников N, P, или N и P в соотношении 1:3. Далее, клетки выращивали в течение трех

недель. Пробы фиксировали через 7, 10, 14 и 21 день после начала эксперимента. Относительное содержание ДНК в ядрах измеряли с помощью конфокального вычислительного цитометра CQ1 Yokogawa.

Через 7 и 10 дней количество клеток с относительным содержанием ДНК 2С не превышало 10%. Через 14 дней доля клеток с относительным содержанием ДНК 2С резко увеличивалось в культуре с дефицитом P (более 60%) и N и P (30%), в то время как в контроле отношение клеток с содержанием ДНК 1С и 2С не изменялось. Более того, в колбах с дефицитом P и N и P появлялась заметная доля клеток с содержанием ДНК 4С (около 5%). Через 21 день после начала эксперимента доля 2С клеток в культурах с дефицитом P и N и P составляла около 60%, в контроле около 5%. Через 24 часа после добавления полной свежей среды в соотношении 1:1 количество 4С клеток увеличивалось до 15% в культурах, голодавших по P и по N и P. Через 3–4 дня доля клеток с относительным количеством ДНК 2С уменьшалась и снова составляла 5–10% во всех экспериментальных колбах.

Удивительно, но мы не наблюдали массового слияния клеток (гамет) в культурах с недостатком P, хотя относительное содержание ДНК удваивалось, а затем появлялась 4С популяция клеток. Поиск стадии слияния будет продолжен, но тем не менее, нельзя исключать и возможную эндоредупликацию хромосом в клетках *P. minimum* в условиях дефицита P. Данная гипотеза требует экспериментальной проверки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-34-00907), Российского научного фонда (проект 19-14-00109) на базе Института цитологии РАН.

**О.Г. Камышачкая^{1,2}, Е.С. Мезенцев^{1,2},
О.Ю. Гордецкая^{1,2}, А.В. Смирнов², Е.С. Насонова^{1,2}**

ОСОБЕННОСТИ ТОНКОГО СТРОЕНИЯ *PARAMICROSPORIUM VANNELLAE* (OPISTHOKONTA: ROZELLOMYCOTA) — ВНУТРИЯДЕРНОГО ПАРАЗИТА АМЕБ *VANNELLA SP*

¹ *Лаборатория цитологии одноклеточных организмов, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Кафедра зоологии беспозвоночных, Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

**O. Kamyshatskaya^{1,2}, Y. Mezentsev^{1,2},
O. Gordetskaya^{1,2}, A. Smirnov², E. Nasonova^{1,2}**

FINE STRUCTURE OF *PARAMICROSPORIUM VANNELLAE* (OPISTHOKONTA: ROZELLOMYCOTA), AN INTRANUCLEAR PARASITE OF *VANNELLA SP*

¹ *Laboratory of Cytology of Unicellular Organisms, Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia*

² *Department of Invertebrate Zoology, Faculty of Biology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia*

oksana.kamyshatskaya@gmail.com

Rozellomycota (synonym. *Rozellosporidia*, *Cryptomycota*) — малоизученная группа облигатных паразитических организмов, родственная грибам

и микроспоридиям. Скрытое разнообразие розеллид велико, получены сотни последовательностей их генов рРНК из окружающей среды, но лишь несколько видов описаны на организменном уровне. Среди них особое место занимают паразиты амёб, жизненный цикл которых проходит в основном внутри ядра хозяина. Единственная стадия, которую можно обнаружить вне клетки хозяина — споры, попадающие во внешнюю среду при разрушении клетки амёбы.

Развитие *Paramicrosporidium vannellae* KAUN-1 начинается с проникновения споры внутрь клеток хозяина. Споры попадают в клетку в процессе фагоцитоза. На это указывает наблюдение спор, находящихся вместе с другими пищевыми объектами внутри пищевых вакуолей. В некоторых вакуолях также были обнаружены пустые оболочки спор, внутрь которых заходят цитоплазматические выросты клетки хозяина. По-видимому, таким образом клетка амёбы взаимодействует с клетками паразита, но что именно происходит со спорами внутри пищевых вакуолей — пока не известно. Все последующие стадии жизненного цикла развиваются, вероятно, под оболочкой ядра амёбы (никаких внутрицитоплазматических стадий паразита нами обнаружено не было). Механизм проникновения паразита в ядро хозяина неизвестен и требует дополнительных исследований. Зараженные ядра амёб увеличены в размерах по сравнению с ядрами в незараженных клетках и приобретают нетипичную форму: у них появляются лопастевидные отростки. Зачастую в ядре хозяина наблюдали одновременное (но необязательно синхронное) развитие нескольких паразитов.

Самые ранние стадии, тонкое строение которых удалось изучить, — ранние споронты. Они локализованы в кариоплазме, но не внутри эндосомы (в отличие от других внутриядерных розеллид), и представляют собой клетки округлой формы с одиночными ядрами. После серии ядерных делений из споронта образуется спорогональный многоядерный плазмодий. В ходе развития он увеличивается в размерах, занимая постепенно весь объем ядра хозяина. Следующая стадия — спорофорный пузырек содержит множество одноядерных споробластов, из которых формируются споры. В спорах обнаружены структуры, напоминающие элементы аппарата экстрезии микроспоридий и мечниковеллид.

Клетки *P. vannellae* на каждой стадии жизненного цикла имеют как минимум одну митохондрию с тубулярными кристами и электронно-светлым матриксом. Предположение о наличии функциональных митохондрий у представителей рода *Paramicrosporidium* было сделано только на основании описания митохондриального генома *P. saccatoeae*. Наши данные на морфологическом уровне доказывают наличие митохондрий у этих паразитов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 19-74-20136 с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Культивирование микроорганизмов» Научного парка СПбГУ.

Д.С. Киреева^{1,2}, А.Н. Игнатьева¹,
С.М. Малыш¹, Ю.С. Токарев¹, И.В. Исси¹

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МИКРОСПОРИДИЙ, СОБРАННЫХ В СЕРЕДИНЕ ПРОШЛОГО ВЕКА

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

² Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина, Санкт-Петербург, Россия

D.S. Kireeva^{1,2}, A.N. Ignatieva¹,
S.M. Malysh¹, Y.S. Tokarev¹, I.V. Issy¹

MOLECULAR GENETIC DIAGNOSTICS OF MICROSPORIDIA COLLECTED IN THE MIDDLE OF THE PAST CENTURY

¹ All-Russian Research Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg, Russia

² Leningrad State University named after A.S. Pushkin, Saint-Petersburg, Russia

stelmdarya@yandex.ru

Микроспоридии — облигатные внутриклеточные паразиты животных, наиболее широко распространённые в членистоногих, в частности у насекомых. За предыдущие десятилетия микроспоридий определяли на основе закономерностей развития, видов хозяев и морфологии спор на светооптическом уровне. Сейчас систематика микроспоридий основана на таких признаках, как размер и форма спор, число витков полярной трубки и её структура, а также особенности жизненного цикла. Но все эти методы не дают таких точных сведений о таксономической принадлежности и филогении паразитов, как молекулярно-генетический анализ, который стал использоваться повсеместно сравнительно недавно. Многие виды микроспоридий находятся в коллекциях, которые идентифицировали только светооптическими методами, поэтому для современной систематики и таксономии необходим анализ ранее описанных видов с помощью молекулярно-генетических исследований.

Материалом для исследования служили 54 образца из коллекции, собранные во второй половине XX века, которые хранились при +4 °С в разных объемах жидкости. Все пробы анализировали с помощью световой микроскопии при увеличении 400X1. В 26 образцах из 54 были обнаружены микроспоридии. Из всех вариантов экстрагировали ДНК методом СТАВ (Sambrook et al., 1989). Затем ставили ПЦР с универсальными праймерами: 18f/1047r (Weiss, Vossbrinck, 1999), и анализировали полученные результаты. Положительные образцы очищали из агарозного геля и секвенировали.

В результате мы подтвердили, что молекулярно-генетический анализ является более чувствительным методом, чем светооптический, так как с помощью световой микроскопии из 54 проб было выявлено 26 положительных, а с помощью ПЦР положительными оказались 30 проб. Около половины образцов (30) сохранились в достаточной степени для молекулярно-генетических исследований при хранении свыше 50 лет. Нами получено 8 целевых сиквенсов. Например, у микроспоридии из дубового походного шелкопряда *Thaumetopoea processionea* из Закарпатья обнаружен уникальный молекулярный гаплотип, имеющий сходство на 80% с микроспоридией рода *Mockfordia* из представителей отряда *Psocoptera*. Все выявленные изоляты принадлежат

IV кладе Древа жизни микроспоридий, но разным филогенетическим ветвям.

Ожидается, что при дальнейшем анализе коллекции будут выявлены новые формы и расширены представления о генетическом разнообразии, распространении и филогенетических связях микроспоридий насекомых фауны СССР.

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБНУ ВИЗР 0665-2019-0018.

М.Д. Лаврова^{1,2}, А.А. Агапов¹, А.В. Кульбачинский¹
ВЛИЯНИЕ GRE-ПОДОБНЫХ
БЕЛКОВ СТРЕССОУСТОЙЧИВОЙ
БАКТЕРИИ DEINOCOCCUS GOBIENSIS
НА ТРАНСКРИПЦИЮ

¹ Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

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

M.D. Lavrova^{1,2}, A.A. Agapov¹, A.V. Kulbachinskiy^{1,3}
AFFECT OF GRE-LIKE PROTEINS FROM STRESS
RESISTANT BACTERIUM DEINOCOCCUS
GOBIENSIS ON TRANSCRIPTION

¹ Institute of Molecular Genetics Russian Academy of Science, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow, Russia

lavrova.maria.dm@gmail.com

Бактерия *Deinococcus gobiensis* выдерживает до 15000 Гр γ -излучения, что делает ее одной из самых радиостойких бактерий, известных на данный момент. Механизмы, отвечающие за выживание в стрессовых условиях, продолжают активно исследоваться. Однако уже сейчас понятно, что чрезвычайная стрессоустойчивость бактерий *Deinococcus* — это результат комбинации множества факторов. Своевременное включение адаптационных механизмов в ответ на стрессовое воздействие требует сложной регуляции транскрипции. Согласно данным, полученным при исследовании бактерий *D. radiodurans* и *D. peraridilitoris*, в этот процесс могут быть вовлечены Gre-подобные транскрипционные факторы, связывающиеся во вторичном канале РНК-полимеразы (РНКП) и не образующие прямых контактов с ДНК. В этой работе мы анализировали *in vitro* два белка *D. gobiensis* из группы Gre-подобных белков: GreA и Gfh1.

Мы выделили РНК-полимеразу из клеток *D. gobiensis*, а также белки GreA и Gfh1 *D. gobiensis*, экспрессированные в клетках *E. coli*. Затем мы исследовали эффекты Gre-подобных белков на различные стадии транскрипционного цикла в *in vitro* системах транскрипции. Мы показали, что оба Gre-подобных фактора проявляют транскрипционные свойства, аналогичные своим гомологам в других бактериях рода *Deinococcus*. GreA активирует эндонуклеазное расщепление и усиливает остановку РНКП в участках ДНК, содержащих поврежденные нуклеотиды. Gfh1 ингибирует синтез РНК уже на стадии инициации транскрипции, а также усиливает терминацию транскрипции. Результаты этой работы свидетельствуют об универсальности механизма регуляции работы РНКП Gre-подобными белками у бактерий рода *Deinococcus* и дают дополнительные основания

предполагать роль этих транскрипционных факторов в стрессоустойчивости.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 17-14-01393.

К.Н. Лотонин¹, И.А. Удалов²

СООТНОШЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО
И «МОЛЕКУЛЯРНОГО» ВИДА АМЕБ
СЕМЕЙСТВА PARAMOEVIDAE

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

² Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

K.N. Lotonin¹, I.A. Udalov²

A CORRESPONDENCE OF MORPHOLOGICAL
AND “MOLECULAR” SPECIES OF AMOEBAE
OF THE FAMILY PARAMOEVIDAE

¹ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

² Zoological institute RAS, Saint-Petersburg, Russia

chlamydophrys@gmail.com

Подавляющее большинство видов голых лобозных амёб считаются агамными организмами, поэтому к ним не применим репродуктивный критерий для различения видов. В течение очень долгого времени единственной концепцией вида, используемой специалистами по этой группе, была морфологическая. Проблема видовой идентификации многих видов этих протистов заключается в очень малом количестве чётких морфологических признаков, позволяющих их различать. С возникновением молекулярно-филогенетических методов появилась возможность использовать последовательности нуклеотидных маркеров в случаях, когда границы между морфологическими видами размыты. Однако нередко исследователи сталкиваются с несоответствием морфологических видов с выявленными «молекулярными». На уровне молекулярных маркеров различие между отдельными морфологическими видами оказываются менее существенным, чем между некоторыми штаммами других морфологических видов.

Одно из возможных решений этой проблемы — исследование изменчивости молекулярных маркеров у голых лобозных амёб, имеющих чёткие межвидовые морфологические различия. Таковыми являются амёбы, имеющие сложноорганизованные видоспецифичные чешуйки в составе клеточных покровов. Выявив различия по молекулярному маркеру между такими чётко очерченными морфологическими видами, мы в дальнейшем сможем экстраполировать эти данные на другие, более проблематичные группы этих протистов.

В качестве молекулярного маркера нами был выбран ген COX1, являющийся наиболее чувствительным и легко амплифицируемым ДНК-штрихкодом у голых лобозных амёб. Нами были исследованы представители двух родов семейства Paramoebidae: *Korotnevella*, обладающий видоспецифичными чешуйками, и близкий к нему род *Pseudoparamoeba*, виды которого слабо различаются на морфологическом уровне. Филогенетический анализ на основе этого маркера у 12 морфологических видов *Korotnevella* показал чёткое соответствие между морфологией чешуек и молекулярными данными. Уровень различия по этому маркеру

между морфологическими видами *Korotnevella* составил 8–23%. Род *Pseudoparamoeba*, помимо типового вида *P. pagei*, включает еще два описанных нами вида, *P. microlepis* и *P. garorimi*. Все три вида морфологически неразличимы. В то же время уровень различия между этими видами по маркеру COX1 оказался весьма значительным и составил 19–25%. Экстраполируя данные, полученные нами для рода *Korotnevella*, можно заключить, что род *Pseudoparamoeba* представлен видами-двойниками, которые в то же время являются хорошо очерченными на молекулярном уровне.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № АААА-А19-119031200042-9 и проекта РФФИ № 18-34-00595.

С.А. Малявин¹, Л.А. Шмакова¹

КОНФЛИКТ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФИЛОГЕНИЙ РОДА АСАНТАМОЕВА (АМОЕВОЗОА) МОЖЕТ БЫТЬ СВЯЗАН С ВНУТРИГЕНОМНЫМ ПОЛИМОРФИЗМОМ 18S

¹ Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН — обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

S.A. Malavin¹, L.A. Shmakova¹

CONFLICT OF MOLECULAR PHYLOGENIES OF THE GENUS ACANTHAMOEBA (AMOEBOZOA) MAY BE ASSOCIATED WITH INTRAGENOMIC POLYMORPHISM OF 18S

¹ Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science RAS, Pushchino, Russia

malavin@pbcras.ru

Молекулярная филогения рода *Acanthamoeba* традиционно строилась на ядерном гене 18S рПНК. Полученные таким образом системы в масштабе рода хорошо соответствуют системам, построенным по морфологическим и аллозимным данным. В частности, подтверждается близость нескольких видов, включая типовой, в результате чего сформировалось представление о них как о «комплексе *Acanthamoeba castellanii*». С точки зрения филогении 18S, этот комплекс представляет собой наиболее обширный и гетерогенный кластер, внутри которого обнаруживается несколько кластеров меньшего масштаба.

Поскольку секвенирование гена 18S сопряжено с некоторыми сложностями, предпринимались попытки упростить процесс молекулярной идентификации новых изолятов. В частности, было предложено использование в качестве маркера значительно более короткого митохондриального гена 16S рПНК. В масштабах рода филогения 16S хорошо соответствует филогении 18S, однако внутри комплекса *castellanii* обнаруживает несколько противоречий. Противоречия эти носят «перекрестный» характер: для трех штаммов А, В и С, из которых в первой филогении А и В попадают в один кластер, а С в другой, во второй филогении А и С попадают в один кластер, а В в другой. Таких случаев отмечено несколько, и кластеры, в которые попадают штаммы, статистически достоверны. «Перекрестный» характер этих противоречий не позволяет интерпретировать их как результат большей разрешающей способности одной из филогений. Более того, аналогичные противоречия демонстрирует

и филогения, построенная по митохондриальному гену Cox1.

Мы предлагаем гипотезу, согласно которой наблюдаемые противоречия в филогениях гена 18S и митохондриальных генов у акантамеб обусловлены наличием в одной и той же клетке нескольких вариантов гена 18S, попадающих в разные 18S-кластеры. При проведении ПЦП успешно амплифицируется только доминантный аллель, что приводит к наблюдаемым противоречиям. Аргументы в пользу этой гипотезы — часто наблюдаемая картина контаминации сиквенсов при секвенировании ДНК моноклональной культуры, разные варианты 18S из правой и левой контактных линз пациента и даже из одной линзы, а также подтвержденный полиморфизм гена 18S как у акантамеб, так и у других Amoebozoa.

Обнаруженные противоречия заставляют отказаться от гена 18S рПНК как основного в систематике комплекса видов *castellanii* и строить систему на основе митохондриальных генов, в идеале — полных митохондриальных геномов.

Работа выполнена в рамках госзадания № О191-2019-0044 и поддержана грантами РФФИ № № 18-04-00824 и 17-54-150003.

О.В. Матанцева¹, М.А. Бердиева¹,
В.О. Калинина¹, И.А. Поздняков¹,
С.А. Печковская¹, П.Ю. Сафонов^{1,2}

ФИЗИОЛОГИЯ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ ВО ВРЕМЯ ПЕРЕСТРОЙКИ КЛЕТОЧНЫХ ПОКРОВОВ

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

O.V. Matantseva¹, M.A. Berdieva¹, V.O. Kalinina¹,
I.A. Pozdnyakov¹, S.A. Pechkovskaya¹, P.Y. Safonov^{1,2}

DINOFLAGELLATE PHYSIOLOGY DURING THE CELL COVERING REARRANGEMENT

¹ Institute of Cytology RAS, St-Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

matantseva@incras.ru

Динофлагелляты — это одноклеточные эукариотические организмы, обладающие рядом уникальных черт строения и физиологии. Среди них — способность к реорганизации клеточных покровов в ответ на стрессовые воздействия среды. Данный процесс, называемый экдизисом, представляет собой самую масштабную перестройку клеточной мембраны, известную у эукариот, и, несомненно, имеет важное адаптационное значение. Тем не менее, экдизис динофлагеллят до сих пор слабо изучен. В частности, неизвестно, какие физиологические изменения претерпевает клетка в процессе перестройки покровов, сохраняется ли её нормальная активность в отношении поглощения питательных соединений, фотосинтеза, дыхания и пр. Мы изучали клетки динофлагеллят, находящиеся на различных этапах искусственно индуцированной реорганизации покровов, используя сочетание методов клеточной биологии, в том числе трансмиссионную электронную микроскопию, иммуноцитохимию, секвенирование транскриптомов, мечение стабильными изотопами и масс-спектрометрию вторичных ионов. Показано, что в лабораторных условиях экдизис у динофлагеллят *Prorocentrum minimum* может быть

индуцирован рядом физических и химических факторов, среди которых центрифугирование — наиболее простой способ запустить этот процесс у большей части (более 90%) клеток в культуре с целью его экспериментального изучения. В результате иницирования перестройки покровов формируются временные цисты динофлагеллят, не обладающие жгутиками и окружённые экстраклеточными целлюлозными пластинами, выход из которых представляет собой эксцистирование клетки. Клетки, находящиеся в состоянии временных цист, характеризуются сниженным уровнем транскрипции генов, отвечающих за фотосинтез и дыхание, однако продолжают поглощать неорганические формы углерода (бикарбонат-ионы) и азота (нитрат-ионы), хотя паттерн распределения вновь ассимилированного углерода и азота отличается от такового у вегетативных клеток. В частности, через три часа после начала экдизиса наблюдается активное включение углерода в областях соединения двух целлюлозных текальных пластин клеток, что отражает процесс подготовки к эксцистированию и проливает свет на возможные механизмы выхода из старых текальных пластин. Продемонстрировано, что в момент выхода из цисты клетка уже несёт вновь сформированные жгутики, а её цитоплазма наполнена везикулами, несущими мембранные транспортеры нитрата и мочевины. Полученные данные важны для расширения представлений о физиологии эукариотических клеток, понимания динамики природных и лабораторных популяций динофлагеллят, а также решения таких важных задач, как предсказание и предотвращение их цветений в прибрежных водах морей и океанов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-74-10093.

Е.С. Мезенцев, О.Г. Камышацкая, А.В. Смирнов
РАЗНООБРАЗИЕ СТРУКТУРНОЙ
ОРГАНИЗАЦИИ ЯДРА АМЕБ СЕМЕЙСТВА
THECAMOEVIDAE (АМОЕВОЗОА: DISCOSEA)

Санкт-Петербургский Государственный Университет,
 Санкт-Петербург, Россия

Y.S. Mesentsev, O.G. Kamyshatskaya, A.V. Smirnov
THE VARIETY OF THE NUCLEUS STRUCTURAL
ORGANIZATION OF AMOEBAE OF THE FAMILY
THECAMOEVIDAE (АМОЕВОЗОА: DISCOSEA)

Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg,
 Russia

Limobestia@yandex.ru

Одними из самых крупных лобозных амёб, которые часто присутствуют в высевах, являются представители семейства Thecamoebidae. Их легко опознать в накопительных культурах благодаря гладким очертаниям, отсутствию дискретных псевдоподий и наличию складок и дорсальных гребней на поверхности клетки. Большинство текамебид можно определить до вида на светомикроскопическом уровне на основании сравнительного анализа локомоторной формы и морфологии ядра; что особенно характерно для представителей центрального рода *Thecamoeba*.

В ходе наших исследований по изучению биоразнообразия амёб из наземных местообитаний нами были изолировано более 60 штаммов текамебид, большую часть которых составляют такие виды как *T. quadrilineata* и *T. similis*; небольшое количество штаммов были определены

как редкие виды, такие как *T. striata*, *T. terricola* и *Sappinia diploidea*; также были получены штаммы, которые сильно отличаются по организации внутриядерного материала от известных видов текамебид.

Среди текамебид многие виды имеют в ядре единственную центральную сферическую эндосому: одноядерные *T. quadrilineata* и представители штамма Та4, а также двуядерные *S. diploidea*. Некоторые текамебиды имеют сходную центральную эндосому, однако состоящую из мелких гранул (Та119) или плотно прилегающих тонких шнуров (Та87). Отличительной особенностью ядер у амёб штаммов Та51 и Та133 является наличие одной или двух центральных эндосом несущих глубокие впадины и каналы. У амёб вида *T. terricola* внутриядерный материал представлен большим количеством мелких округлых телец, занимающих как периферию, так и центральную область ядра. Отдельные виды рода *Thecamoeba* характеризуются периферическими эндосомами, однако трехмерная организация этих структур может сильно отличаться. Внутриядерный материал у амёб вида *T. similis* представлен отдельными периферическими линзовидными телами, в то время как похожие отдельные эндосомы на срезе ядра штамма Та72 могут являться частью единой сложной разветвленной сети. В ядрах амёб штамма Та130 можно одновременно обнаружить различные структуры: плоскую периферическую пластину со множеством лагун, толстые однородные линзовидные тела и плотные конгломераты отдельных эндосом. От известных среди текамебид вариантов сильно отличается структурная организация ядер штаммов Та91 и Та117: для первого характерно наличие множественных сферических тел с радиальными каналами, а для второго — периферические плоские пластины, состоящие из многочисленных мелких гранул. Выявленные нами разнообразие и стабильность структурной организации интерфазных ядер текамебид, позволяют использовать этот признак в качестве одного из основных для описания и идентификации видов.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект 19-34-90155).

Т.И. Миронов, А.Ю. Яковлев,
С.И. Черныш, Е.В. Сабанеева

СТАБИЛЬНОСТЬ СИМБИОТИЧЕСКОЙ
СИСТЕМЫ ИНФУЗОРИЯ PAREMECIUM
MULTIMICRONUCLEATUM / БАКТЕРИЯ
CA. TRICHORICKETTSIA MOBILIS ПРИ
ВОЗДЕЙСТВИИ ПРОТИВОБАКТЕРИАЛЬНЫМИ
АГЕНТАМИ

Санкт-Петербургский Государственный университет,
 Санкт-Петербург, Россия

T.I. Mironov, A.Y. Yakovlev,
S.I. Chernysh, E.V. Sabaneyeva

STABILITY OF SYMBIOTIC SYSTEM THE CILIATE
PAREMECIUM MULTIMICRONUCLEATUM / THE
BACTERIUM CA. TRICHORICKETTSIA MOBILIS
UNDER TREATMENTS WITH ANTIBACTERIAL
AGENTS

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg,
 Russia

ghostelf@mail.ru

Инфузории известны своей способностью формировать симбиотические ассоциации с бактериями. Отношения между партнерами в таких системах охватывают все варианты от мутуализма до паразитизма. Установить, каковы эти отношения в системе, бывает сложно. Одним из подходов к решению этой задачи является применение антибактериальных препаратов с целью оценки последствий для клетки-хозяина.

Проведена оценка жизнеспособности инфузории *Paramecium multimicronucleatum* и ее способности поддерживать своих подвижных внутриядерных симбионтов *Ca. Trichorickettsia mobilis* после обработки антибиотиками с различным механизмом действия (ампициллин, стрептомицин, хлорамфеникол, тетрациклин) и противобактериальным экстрактом гемолимфы личинок *Calliphora vicina* FLIP. Присутствие эндосимбионтов в клетке хозяина определяли путем прижизненных наблюдений с помощью световой микроскопии с использованием контраста Номарского и/или флуоресцентной гибридизации *in situ* с видоспецифичным олигонуклеотидным зондом (FISH).

Обработка антибиотиками, традиционно используемыми для лечения риккетсиозов, тетрациклином и хлорамфениколом, в зависимости от использованной концентрации и тестируемого клона, либо приводила к гибели как зараженных, так и контрольных инфузорий, либо не влияла на их способность поддерживать внутриядерных эндосимбионтов. В выживших клетках в макро-нуклеусе всегда присутствовали подвижные бактерии. Применение стрептомицина не приводило к потере эндосимбионтов ни в одном из четырех протестированных клонов, и практически все клетки инфузорий оставались жизнеспособными. Ампициллин никогда не приводил к гибели инфузорий, однако вызывал образование септированных и неподвижных овальных форм бактерий. При неоднократных регулярных обработках ампициллином с помощью FISH и ТЭМ был зарегистрирован выход части эндосимбионтов за пределы ядра. Вышедшие из ядра бактерии часто были заключены в вакуоль, по-видимому, соответствующую аутофагосоме, однако признаков деградации бактерий часто не наблюдалось.

В присутствии FLIP зараженные эндонуклеобионтами инфузории демонстрировали лучшую выживаемость, чем незараженные контрольные инфузории, что может свидетельствовать о том, что присутствие эндосимбионта в ядре инфузории повышает ее жизнеспособность. Ни один из использованных антибактериальных препаратов не позволил получить апосимбиотические клеточные линии.

При поддержке гранта РФФИ 18-04-00562а.

И.А. Морозов, А.П. Годовалов

ВЛИЯНИЕ МИКРОБНЫХ ПОЛИАМИНОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия

I.A. Morozov, A.P. Godovalov

INFLUENCE OF MICROBIAL POLYAMINES ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF PHAGOCYtic CELLS

E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia

Lonny8@yandex.ru

Изучение фагоцитарной активности лейкоцитов продолжается уже более века, когда И.И. Мечников впервые описал механизм и стадии этого процесса. Однако до настоящего времени сохраняется ряд нерешенных вопросов при детальном изучении, в том числе на молекулярном уровне, фагоцитоза разных по патогенности микроорганизмов. Так, например, до конца не установлен спектр микробных метаболитов, оказывающих влияние на функциональную активность лейкоцитов. В ряде исследований показано, что при взаимодействии про- и эукариотических клеток в ходе иммунного ответа повышается содержание полиаминов — производных аминокислот. В то же время установлено, что условно патогенные бактерии синтезируют преимущественно диамины: путресцин и кадаверин.

Цель исследования — изучение влияния путресцина и кадаверина на фагоцитарную и радикалпродуцирующую активность лейкоцитов периферической крови здоровых доноров.

Материалы и методы. Изучали фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови (20-и доноров) при помощи теста с формализированными эритроцитами барана (ФЭБ) и их способность к продукции радикалов методом люминолзависимой хемолуминосценции. Лейкоциты прединкубировали с кадаверином (0,01 мМ) и путресцином (0,01 мМ) 60 минут при 37°C. Для оценки жизнеспособности клеток использовали тест с трипановым синим. Результаты обрабатывали с помощью парного варианта *t*-критерия Стьюдента.

Результаты. Установлено, что путресцин и кадаверин не оказывали существенного влияния на жизнеспособность лейкоцитов периферической крови, однако снижали их фагоцитарную активность. Особенно выражено полиамины действовали на фагоцитоз ФЭБ нейтрофильными гранулоцитами. Прединкубация лейкоцитов с кадаверином приводила к перераспределению соотношения неактивных и активных фагоцитов в сторону последних. Кроме влияния на фагоцитарную активность путресцин и кадаверин уменьшали продукцию лейкоцитами кислородных радикалов. В целом, можно предположить, что микроорганизмы с помощью полиаминов создают для себя благоприятную среду обитания, снижая микробцидность фагоцитирующих клеток.

Заключение. Способность кадаверина и путресцина подавлять функциональную активность лейкоцитов при сохранении их жизнеспособности можно рассматривать как механизм, который обеспечивает реализацию персистентного потенциала в особенности условно патогенными микроорганизмами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ и Администрации Пермского края 16-44-590429 p_a.

**В.А. Мусарова¹, Д.С. Матюшкина¹,
Т.В. Григорьева², И.О. Бутенко¹, В.М. Говорун¹
ТРАНСКРИПТОМНЫЙ И ПРОТЕОМНЫЙ
АНАЛИЗЫ БАКТЕРИИ *ESCHERICHIA COLI*
ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ СЕКРЕТОРНЫМИ IGA**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства», Россия, Москва

² Институт фундаментальной медицины и биологии Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань

**V.M. Musarova¹, D.S. Matyushkina¹,
T.V. Grigoryeva², I.O. Butenko¹, V.M. Govorun¹
TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC ANALYSIS
OF THE *ESCHERICHIA COLI* BACTERIA AFTER
SECRETORY IGA PROCESSING**

¹ Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Russia, Moscow

² Institute of Fundamental Medicine and Biology Kazan Federal University, Kazan, Russia

varvaramys@rcpcm.org

Нарушение гомеостаза желудочно-кишечного тракта, изменение в составе микробиоты кишечника в пользу патогенных штаммов бактерий приводит к воспалительным заболеваниям кишечника, таким как болезнь Крона (БК) и язвенный колит. Известно, что состав микробиоты млекопитающих регулируется секреторным иммуноглобулином класса А (IgA), выделяемым в просвет кишечника и покрывающим около 75% микробиома хозяина. Однако как именно IgA регулирует состав микробиоты остается плохо изученным вопросом. Условно-патогенная бактерия *Escherichia coli*, встречающаяся в относительно небольших количествах, по сравнению с другими симбиотическими видами, может стать причиной хронического заболевания БК, поскольку процентное отношение кишечной палочки к общему составу микробиоты увеличивается у большинства пациентов, страдающих БК.

В нашей работе с помощью конфокальной микроскопии была определена оптимальная концентрация антител IgA для связывания с *E. coli*. Для идентификации определенных белковых паттернов бактерии, с которыми связываются моноклональные антитела и для идентификации белков, с которыми связались антитела, были проведены вестерн-блот и ВЭЖХ-масс-спектрометрический анализ. С помощью протеомного и транскриптомного анализов бактерий, обработанных антителами, были идентифицированы гены и представленность белков, увеличение которых коррелировало между собой: белки и соответствующие им гены, участвующих в ответе на окислительный стресс (WrbA), окислительный стресс (AscA) осмотический стресс (OsmY, OsmE), поринов семейства Omp, пили (FimA и FimC), регуляторов транскрипции (RpoS), систем репарации (HchaA, AidB), транспорте веществ (DppA, HlyD) а также белков, вовлеченных в метаболизм (SucC, Mdh).

Исходя из полученных протеомных и транскриптомных результатов, можно сделать вывод, что связывание антител с бактериями вызывает сильный физиологический ответ со стороны бактерии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-00-00293.

**М.М. Орехова¹, В.В. Белоусова¹, Н.Е. Морозова¹,
И.Е. Вишняков^{1,2}, М.В. Якунина¹**

**РЕГУЛЯЦИЯ РАННЕЙ ТРАНСКРИПЦИИ
У ГИГАНТСКОГО БАКТЕРИОФАГА *PHIKZ***

¹ Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

² Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

**M.M. Orekhova¹, V.V. Belousova¹, N.E. Morozova¹,
I.E. Vishnyakov^{1,2}, M.V. Yakunina¹**

**REGULATION OF EARLY TRANSCRIPTION
IN GIANT BACTERIOPHAGE *PHIKZ***

¹ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

yakuninam@gmail.com

В ходе инфекции, вызванной литическими бактериофагами, обычно выделяют три стадии развития фага: раннюю, среднюю и позднюю. «Переключение» экспрессии фаговых генов одной стадии на экспрессию генов другой стадии происходит, как правило, на уровне транскрипции. Транскрипция — первый и основной этап экспрессии генов. Транскрипция у всех клеточных организмов осуществляется с помощью фермента ДНК-зависимой РНК-полимеразы (РНКП), являющейся главной мишенью для регуляции. В отличие от всех ранее исследованных фагов транскрипция генома гигантского бактериофага *phiKZ* в ходе инфекции клетки хозяина осуществляется двумя собственными неканоническими мультисубъединичными ДНК-зависимыми РНК-полимеразами (РНКП) без участия бактериальной РНКП. Одна из фаговых РНКП, названная вирионной (вРНКП), попадает внутрь клетки вместе с фаговой ДНК из фаговой частицы (вириона) и осуществляет транскрипцию ранних генов фага. Вторая РНКП, названная невирионной (нвРНКП), синтезируется в клетке в процессе инфекции и осуществляет транскрипцию поздних генов. Как осуществляется транскрипция средних генов и механизмы переключения транскрипции между разными стадиями остаются неизвестными. Было показано, что ко второй половине инфекции количество вРНКП в клетке увеличивается на два порядка, однако транскрипция ранних генов прекращается. Для того чтобы понять механизм остановки ранней транскрипции мы проследили, где находится вРНКП во второй половине инфекции. В ходе инфекции клетки фагом *phiKZ* в центре клетки образуется сферическая структура (псевдо-ядро), внутрь которой упаковывается вся имеющаяся в клетке ДНК и часть белков участвующих в репликации и транскрипции ДНК. С помощью методов флуоресцентной микроскопии и иммуноцитохимического окрашивания с использованием частиц золота было показано, что вРНКП локализуется снаружи псевдо-ядра, тогда как нвРНКП обнаруживается и внутри псевдо-ядра. Вероятно, такое

разобщение вРНКП и ДНК-матрицы обеспечивает прекращение ранней транскрипции.

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

Д.А. Падий^{1,2}, Н.А. Шевченко^{1,2}, В.А. Плуца¹
УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК
К НАНОЧАСТИЦАМ СЕРЕБРА ПРИ ДЕЙСТВИИ
ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ,
СИНТЕЗИРУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ; РОЛЬ
ГЛОБАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ

¹ Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

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

D.A. Pady^{1,2}, N.A. Shevchenko^{1,2}, V.A. Pluyta¹.

THE RESISTANCE OF BACTERIAL CELLS
TO SILVER NANOPARTICLES UNDER EFFECT
OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS
EMITTED BY BACTERIA; THE ROLE OF GLOBAL
REGULATORY GENES

¹ Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia

² D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

padydarya@gmail.com

Микробные летучие органические соединения (ЛОС) имеют различные биологические функции: могут стимулировать/подавлять рост других организмов, быть медиаторами в межклеточных взаимодействиях и др. Важная роль ЛОС в жизнедеятельности биологических объектов стала причиной повышенного интереса ученых к этим соединениям в последние десятилетия. Механизмы действия летучих веществ на клетки микроорганизмов, в частности генетические детерминанты бактерий, вовлеченных в регуляцию ответа к действию ЛОС, изучены мало.

В данной работе изучалась роль трех глобальных регуляторных генов, контролирующих экспрессию большого количества генов, в том числе отвечающих за устойчивость бактериальной клетки к различным типам стресса, при действии ЛОС различной химической структуры. Ген *groS* кодирует сигма S субъединицу РНК-полимеразы; ген *srp* кодирует белок, участвующий в контроле катаболической репрессии; ген *lon* кодирует протеиназу, играющую важную роль в деградации дефектных и ряда короткоживущих регуляторных белков. В качестве модельного объекта была использована *Escherichia coli*, поскольку лучше всего генетические детерминанты стрессового ответа изучены у неё.

В ходе работы были получены данные о действии ДМДС и 2-фенилэтанола на динамику роста штамма *E. coli* АВ1157 (исходный штамм, используемый в качестве контроля) и штамма мутацией по гену *lon* (АВ1899). Было показано, что при действии ДМДС (50 и 100 мкмоль) достоверно ухудшался рост клеток (примерно на 15%) штамма мутантного по гену *lon*, по сравнению с контролем. При действии 2-фенилэтанола (50 и 100 мкмоль) и меньших количеств ДМДС инактивация гена *lon* не оказывала заметного эффекта на динамику роста штаммов. Также было показано, что при действии ДМДС и 2-фенилэтанола на: 1) штамм SBS1936 (исходный), штамм мутантный по гену *groS* (SBS2680) и штамм несущий

плазмиду со сверхэкспрессией гена *groS* (SBS1915); 2) штамм MG1655 (исходный), и с мутацией по гену *srp* (АМ306), различия в выживаемости между штаммами не превышали в среднем 7%. Таким образом, установлено, что только ген *lon* играет роль в регуляции устойчивости клеток к высоким количествам ДМДС.

Второй целью работы было изучение совместного действия ЛОС, синтезируемых бактериями, с наночастицами серебра (НЧС). Ранее было показано, что ЛОС могут усиливать антибактериальное действие некоторых антибиотиков. Как известно НЧС также обладают антибактериальным эффектом.

Было установлено, что при действии ДМДС (10, 20 и 30 мкмоль) и 2-фенилэтанола (20, 40 и 60 мкмоль) с НЧС (10, 15 и 20 мкг/мл) выживаемость клеток штамма АВ1157 была ниже в 10–10⁴ раз, по сравнению с действием ЛОС или наночастиц по отдельности. Причем при повышении концентраций обоих веществ увеличивался синергический эффект их действия. Полученные данные могут послужить основой для дальнейшего практического применения ЛОС с НЧС.

Работа частично финансировалась грантом РФФИ № 18-34-00396-мол_а.

С.А. Печковская, Н.А. Князев,
С.О. Скарлато, Н.А. Филатова

СИНТЕЗ БЕЛКА ТЕПЛОГОВО ШОКА
32 КДА В ОТВЕТ НА СОЛЕНОСТНЫЙ
СТРЕСС ФОРМИРУЮЩИХ ВРЕДНОСНЫЕ
ЦВЕТЕНИЯ ИНВАЗИЙНЫХ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ
PROROCENTRUM MINIMUM

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

S.A. Pechkovskaya, N.A. Knyazev,
 S.O. Skarlato, N.A. Filatova

HEAT SHOCK PROTEIN 32 RESPONSE
TO SALINITY STRESS IN BLOOM-FORMING
INVASIVE DINOFLAGELLATES PROROCENTRUM
MINIMUM

Institute of Cytology RAS, St-Petersburg, Russia

sapechkovskaya@gmail.com

Потенциально токсичный вид динофлагеллят *Prorocentrum minimum* является вселенцем в опресненное Балтийское море, где в последние годы формирует вредоносные цветения. Однако молекулярные механизмы, позволяющие поддерживать клеточный гомеостаз этого планктонного вида-вселенца в хорогалинных водах, не достаточно изучены. Отсутствуют данные о биомаркерах стресса, которые важны для прогностической оценки условий, необходимых для процветания динофлагеллят в условиях низкой солености.

В настоящем исследовании было оценено влияние соленостного стресса на синтез шаперона HSP32. Мы идентифицировали последовательности гена HSP32 в неаннотированных транскриптомах *P. minimum* и при помощи филогенетического анализа показали, что найденные последовательности формируют монофилетическую кладу с HSP32 других одноклеточных водорослей. По условиям эксперимента, клетки *P. minimum* культивировали при солености 17‰ в режиме освещения 12 ч день : 12 ч ночь и в режиме освещения 12 ч ночь : 12 ч день (далее будут упоминаться как

дневные или ночные культуры), а затем подвергали соленостному стрессу при 8‰ (хорогалиникум).

Методом проточной цитометрии было показано, что днем подавляющее большинство клеток, культивируемых при 17‰ (контроль), определяется в G₀/G₁-фазе (95,9%), в то время как в S-фазе только 1,7%, а на долю G₂/M-фазы приходится 2,5% клеток. Ночью количество клеток в S-фазе увеличивается до 12,6% и до 4,3% в G₂/M-фазе, за счет сокращения до 83,1% в фазе G₀/G₁. Таким образом, доля клеток в S-фазе ночью была значительно выше, чем днем.

Проточно-цитометрическое измерение уровня белка HSP32 в отдельных клетках позволяет в дальнейшем охарактеризовать гетерогенность в конкретных клеточных популяциях, обеспечивая важный инструмент для решения отношения экспрессия-функция.

Измерение уровня синтеза HSP32 показало, что в контрольных условиях количество клеток *P. minimum*, экспрессирующих этот белок на свету, было в 2,1 раза выше, чем в темноте при одинаковой средней интенсивности флюоресценции клеток (1,7 ед.). После того, как клетки динофлагеллят подвергли соленостному стрессу, количество клеток, экспрессирующих HSP32, на свету достоверно не изменилось, в то время как в темноте увеличилось в 2,6 раза, при этом интенсивность флюоресценции также возросла с 1,7 до 2,0 ед.

Полученные данные свидетельствуют о том, что значительное изменение синтеза HSP32 клетках *P. minimum* может служить своеобразным биомаркером соленостного стресса на свету и в темноте. Исследование уровня изменения синтеза шаперона HSP32, облегчает понимание процессов, определяющих реакции водных микроорганизмов на экологический стресс, а также способствует прогнозированию условий, при которых возникают вспышки цветений потенциально токсичных динофлагеллят.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-14-00109) на базе Института цитологии РАН.

И.А. Поздняков

ВОЗНИКНОВЕНИЕ ЭЛЕКТРОВЗБУДИМОСТИ У ЗУКАРИОТ В СВЕТЕ ЭВОЛЮЦИИ ИОННЫХ КАНАЛОВ СУПЕРСЕМЕЙСТВА P-LOOP

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

I.A. Pozdnyakov

ORIGIN OF ELECTRICAL EXCITABILITY IN EUKARYOTES IN THE LIGHT OF EVOLUTION OF THE P-LOOP SUPERFAMILY ION CHANNELS

Institute of Cytology RAS, St-Petersburg, Russia

pozdneyakov@incras.ru

Электровозбудимыми принято называть клетки, способные генерировать потенциал действия (ПД), который представляет собой волну изменения мембранного потенциала, возникающую в ответ на достижение пороговой величины стимула и развивающуюся по принципу «все или ничего». ПД — распространенное явление среди эукариот и, вероятно, является анцестральным признаком Eukarya. Хотя ПД исчезал и возникал вторично несколько раз среди различных линий эукариот, имеющиеся данные позволяют предположить, что последний общий предок эукариот мог обладать быстрым ПД, напомиающим ПД электровозбудимых клеток животных.

Для осуществления самой возможности генерировать ПД клетка должна удовлетворять двум условиям: 1) иметь относительно протяженную мембрану и 2) иметь элементы, управляемые изменениями мембранного потенциала. Условию 1 удовлетворяют клетки именно с эукариотным типом организации. Условию 2 удовлетворяют потенциал-управляемые ионные каналы, которые возникли еще на уровне прокариот по крайней мере трижды. Это суперсемейства каналов P-loop, H_v и CLC. Мы считаем, что морские условия обитания общего предка эукариот привели к невозможности использования каналов H_v и CLC для генерации ПД.

Анализ структурных данных показывает, что по строению селективного фильтра P-loop-каналы могут быть разделены на две группы: 1) «GYG-каналы», чей селективный фильтр представляет собой своего рода «жесткую бочку», сложенную карбонильными кислородными пептидных связей и 2) «W-каналы», чей селективный фильтр — «гибкое кольцо» боковых радикалов аминокислотных остатков. Нет сомнений, что строение селективного фильтра по типу «жесткой бочки» является анцестральным признаком для всего суперсемейства P-loop каналов. Мы показываем, что если возникновение «GYG-каналов» дало возможность реализовывать фазу реполяризации ПД, то переход селективного фильтра канала от состояния «жесткой бочки» к состоянию «гибкого кольца» дал возможность осуществлять фазу деполяризации ПД. Таким образом, возникновение «W-каналов» было важным шагом в становлении электровозбудимости. На сегодняшний день известно несколько семейств P-loop-каналов, которые можно отнести к «W-каналам»: прокариотные Na_vBas, и эукариотные EukCat, CatSper, TPC и FVCC. Именно каналы FVCC стали использоваться эукариотами для генерации фазы деполяризации ПД и имелись уже у их последнего общего предка. С помощью методов биоинформатики и молекулярной филогении мы демонстрируем сложности, связанные с реконструкцией однодоменного предка четырехдоменных каналов FVCC. Кроме того, мы выдвигаем предположение о том, что приспособленность той или иной группы к пресноводным/почвенным условиям обитания и/или к амебодному типу движения способствует элиминированию генов FVCC и потере электровозбудимости или возникновению ее альтернативных форм.

И.С. Приходько¹, О.Н. Щепин^{1,3},
Г. Морено², А. Лопез-Виллалба²,
Ю.К. Новожилов¹, М. Шниттлер³

**РЕВИЗИЯ РОДА *LEPIDODERMA* DE BARY
(DIDYMIACEAE, MYXOMYCETES)
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФИЛОГЕНИИ**

¹ Лаборатория систематики и географии грибов,
Ботанический Институт им. Комарова РАН, ул.
Профессора Попова, д. 2, г. Санкт-Петербург,
197376, Россия

² Unidad Docente de Botánica, Departamento
de Ciencias de la Vida, Universidad de Alcalá, Alcalá
de Henares 28805, Мадрид, Испания

³ General Botany and Plant Systematics, Institute
of Botany and Landscape Ecology, University
Greifswald, Soldmannstr. 15, Грайфсвальд, 17487,
Германия

I.S. Prikhodko¹, O.N. Shchepin^{1,3}, G. Moreno²,
Á. López-Villalba², Yu.K. Novozhilov¹, M. Schnittler³

**REVISION OF THE GENUS *LEPIDODERMA*
DE BARY (DIDYMIACEAE, MYXOMYCETES)
USING MOLECULAR PHYLOGENETIC
APPROACH**

¹ Laboratory of Systematics and Geography of Fungi,
Komarov Botanical Institute of the Russian Academy
of Sciences, Prof. Popov Str. 2, Saint-Petersburg
197376, Russia

² Unidad Docente de Botánica, Departamento
de Ciencias de la Vida, Universidad de Alcalá, Alcalá
de Henares 28805, Madrid, Spain

³ General Botany and Plant Systematics, Institute
of Botany and Landscape Ecology, University
Greifswald, Soldmannstr. 15, Greifswald 17487,
Germany

Hypnohotep@gmail.com

На данный момент род *Lepidoderma* de Bary включает 15 видов [1], морфологически близких к родам *Didymium* Shrad. и *Diderma* Pers., объединяемых на основании наличия на поверхности перидия известковых отложений в виде кристаллических чешуек, которые иногда сливаются, формируя сплошную корку. Тем не менее, таксономический статус ряда морфовидов, таких как *L. chaillietii* и *L. granuliferum*, служит поводом для дискуссий с начала прошлого века [2], [3]. Ситуацию усложняют молекулярно-генетические данные, указывающие на парафилетическую природу рода. Задача данной работы состоит в реконструкции филогении представителей рода *Lepidoderma* с целью выявить состав и границы рода, а также его положение относительно других родов семейства Didymiaceae.

Нами были получены последовательности фрагментов генов 18S рРНК и COI из порядка 200 гербарных образцов, относящихся к представителям родов *Didymium*, *Diachea*, *Mucilago*, *Diderma* и *Lepidoderma*. В качестве внешней группы были выбраны представители рода *Lamproderma*. Двугенное филогенетическое дерево показало, что большая часть исследованных *Lepidoderma* spp. формирует сестринскую по отношению к *Diderma* spp. кладу, в то время как представители родов *Diachea* и *Mucilago* занимают более базальное положение рядом с родом *Didymium*. Каждому изученному морфовиду в рамках рода *Lepidoderma* соответствует собственная монофилетическая кладка. Результаты анализа

показали, что хотя образцы *L. chaillietii* и *L. carestianum* морфологически сходны, эти виды формируют далеко отстоящие друг от друга ветви на дереве. Более того, последовательности, относящиеся к *L. chaillietii*, группируются в 4 клады, каждая из которых обладает собственными паттернами географического распространения, соседствующих с кладой, включающей 6 образцов *L. aggregatum* Kowalski (гетеротипный синоним *L. chaillietii*). Наконец, двугенный филогенетический анализ показал, что типовой для рода *Lepidoderma* de Bary морфовид *L. tigrinum* формирует крупную ветвь с высокими степенями поддержки внутри клады, соответствующей роду *Diderma*. Полученные результаты вынуждают нас приступить к ревизии рода с последующими номенклатурными перестройками.

Работы выполнены в рамках проекта фонда РФФИ (18-04-01232 А), государственного задания БИН РАН по теме «Биоразнообразие, экология и структурно-функциональные особенности грибов и грибообразных протистов» (AAAA-A19-119020890079-6) и задания Немецкого Исследовательского Совета (DFG: SCHN1080/2-1, RTG 2010).

Литература:

1. Lado, C., 2005–2020. An on Line Nomenclatural Information System of Eumycetozoa. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, Spain. <http://www.nomen.eumycetozoa.com> accessed in February 25, 2020.
2. Lister A., Lister. G.A Monograph of the mycetozoa, 2nd ed. L.: British Museum (Natural History). 1911.
3. Kowalski, D.T. The genus *Lepidoderma* // *Mycologia*. 1971, № 63(3). p. 490–516

Н.А. Румянцева^{1,2}, А.Д. Ведякин^{1,2},
И.Е. Вишняков^{1,2}

**НОВЫЕ ДАННЫЕ О РЕГУЛЯЦИИ ДЕЛЕНИЯ
ПРИ SOS-ОТВЕТЕ В *ESCHERICHIA COLI***

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

N.A. Rumyantseva^{1,2}, A.D. Vedyaykin^{1,2},
I.E. Vishnyakov^{1,2}

**NEW DATA ON THE REGULATION OF CELL
DIVISION DURING SOS RESPONSE
IN *ESCHERICHIA COLI***

¹ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic
University, Saint-Petersburg, Russia
² Institute of Cytology, Russian Academy of Science,
Saint-Petersburg, Russia

misterkotlin@gmail.com

Одним из важнейших событий в жизненном цикле бактерий является деление. FtsZ — ключевой белок бактериального деления (гомолог эукариотического тубулина). Это консервативный белок, который присутствует в большинстве бактерий. В норме процесс деления начинается с образования полимеров FtsZ и сборки кольцевой структуры в центре клетки (Z-кольца) с последующим формированием перегородки между двумя дочерними клетками. В бактериальных клетках существуют системы, которые отвечают за правильное позиционирование Z-кольца, например, в *Escherichia coli* такую роль играют min-система (препятствует сборке Z-кольца вблизи

полюсов клетки) и система нуклеоидной окклюзии (блокирует сборку Z-кольца над нуклеоидами).

Важнейшим регуляторным механизмом, обеспечивающим выживание бактериальных клеток в условиях стресса, является SOS-ответ. Во время SOS-ответа в клетках *E. coli* и родственных ей граммотрицательных бактерий клеточное деление блокируется путем активации синтеза белка SulA, который взаимодействует с FtsZ. Существуют две основные модели, объясняющие, каким образом SulA ингибирует активность белка FtsZ: секвестрация (SulA связывается с мономерами FtsZ в эквимольном соотношении, предотвращая их полимеризацию) и кэпирование (SulA связывается с концом полимера FtsZ, что может приводить, например, к дестабилизации полимеров).

В данной работе была оценена минимальная концентрация белка SulA, достаточная для ингибирования деления клеток *E. coli*. Для этого использовали плазмиду pBAD/HisB в которой ген, кодирующий белок слияния SulA с зеленым флуоресцентным белком mNeonGreen, находится под контролем арабинозного промотора. Данная конструкция позволила оценить концентрацию SulA в клетках несколькими способами: при помощи флуоресцентной микроскопии, спектрофлуориметрии и полуколичественного иммуноблоттинга. Полученные результаты сравнили с концентрацией FtsZ в тех же клетках. Данные показывают, что для эффективной блокировки деления в клетках достаточно относительно небольшой концентрации SulA (примерно в 3–4 раза меньше, чем у FtsZ), что противоречит модели секвестрации.

Также были проанализировано влияние min-системы и системы нуклеоидной окклюзии на восстановление клеток после SOS-ответа. Для этого использовались клетки с флуоресцентно меченным белком FtsZ, в которых отсутствует одна из систем позиционирования. Результаты показывают, что в процессе восстановления деления система нуклеоидной окклюзии играет более важную роль, чем min-система.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-04-01074.

А.Р. Садовская^{1,2}, А.Б. Китаева¹, В.Е. Цыганов¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА В КЛЕТКАХ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ КЛУБЕНЬКОВ СОИ КУЛЬТУРНОЙ (*GLYCINE MAX* L.) И ЛЯДВЕНЦА ЯПОНСКОГО (*LOTUS JAPONICUS* L.)

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург, Россия

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

A.R. Sadovskaya^{1,2}, A.B. Kitaeva¹, V.E. Tsyganov¹

STUDY ON TUBULIN CYTOSKELETON ORGANIZATION IN CELLS OF DETERMINATE NODULE OF *GLYCINE MAX* L. AND *LOTUS JAPONICUS* L

¹ All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia

² St. Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

alexandrasad@mail.ru

У растений микротрубочки играют существенную роль в определении и поддержании формы клетки, направляя движение целлюлозосинтазных комплексов. Ранее нами было показано участие микротрубочек в инфицировании растительных клеток и ориентации в них симбиосом в недетерминированных клубеньках гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula* Gaertn.) [1].

В данном исследовании была изучена структура тубулинового цитоскелета в клубеньках сои культурной (*Glycine max* L.) сорта Fiskeby V и лядвенца японского (*Lotus japonicus* L.) линии Gifu с использованием методов иммунолокализации и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Растения сои культурной и лядвенца японского были инокулированы 4 различными штаммами *Bradyrhizobium japonicum* и 3 штаммами *Mesorhizobium loti*, соответственно, из Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ОСХН РАН.

Оба вида растений характеризовались сходной организацией тубулинового цитоскелета, при этом не было выявлено различий в структуре микротрубочек в зависимости от штамма ризобий. В инфицированных клетках наблюдалась сеть эндоплазматических микротрубочек, ассоциированных с симбиосомами, кортикальные же микротрубочки располагались параллельно друг другу и перпендикулярно продольной оси клетки. В неинфицированных клетках кортикальные микротрубочки перекрещивались между собой, но часть из них располагалась параллельно друг другу. Количественный анализ пространственных трехмерных реконструкций изображений с помощью программы «Microfilament Analyzer» подтвердил различия в организации тубулинового цитоскелета инфицированных и неинфицированных клеток, выявленные визуально.

Работа выполнена в рамках РФФИ 20-316-70004.

Литература:

1. Kitaeva A.B., Demchenko K.N., Tikhonovich I.A., et al. Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*: bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements. *New Phytol.* 2016; 210(1): 168–183.

П.Ю. Сафонов^{1,2}, А.В. Хютти³, И.А. Поздняков¹
СНВД-СОДЕРЖАЩИЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ ЭУКАРИОТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ: РАЗНООБРАЗИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

P.Yu. Safonov^{1,2}, A.V. Khiutti³, I.A. Pozdnyakov¹

СНВД-CHANNELS OF EUKARYOTIC MICROORGANISMS: DIVERSITY AND IDENTIFICATION

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

³ All-Russian Institute of Plant Protection, Saint Petersburg, Russia

spy.ixz@gmail.com

Ионные каналы, имеющие в своей структуре домен связывания циклических нуклеотидов (CNBD), объединяются в семейство родственных белков и, как правило, участвуют в функционировании различных сенсорных систем и систем модулирования мембранного потенциала клеток эукариот. На сегодняшний день наиболее изученными CNBD-содержащими каналами являются каналы HCN, CNG и KCNH животных и K_v -каналы растений, то есть многоклеточных эукариот. Таким образом, необходимо расширить круг исследуемых объектов и включить в анализ каналы эукариотных микроорганизмов, так как отсутствие данных о CNBD-содержащих каналах протистов затрудняет понимание эволюции этого семейства белков.

Поиски гомологов CNBD-содержащих каналов животных и растений проводились в базах данных аминокислотных последовательностей NCBI и транскриптомных транскриптомах Marine Microbial Eukaryotic Transcriptome Sequencing Project представителей различных групп эукариот, а также бактерий и архей. Филогенетическая реконструкция, проведенная по методам максимального правдоподобия и байесовского анализа, выявила значительное разнообразие клад внутри исследуемой группы каналов. Помимо этого, мы провели биоинформационный анализ первичной структуры наиболее функционально важных элементов каналов: селективного фильтра, сенсора напряжения и домена связывания циклических нуклеотидов (CNBD).

Особый интерес вызывает факт наличия в транскриптомах оомицетов и динофлагеллят последовательностей тандемных HCN-подобных каналов (2xHCNL), обладающих нехарактерным для представителей данного семейства удвоенным субъединичным составом. Для дальнейшего анализа были выбраны аминокислотные последовательности 2xHCNL-каналов динофлагелляты *Prorocentrum minimum* и оомицета *Phytophthora infestans*. Компьютерное моделирование вторичных структур этих гомологов позволило нам подобрать подходящие эпитопы. Выбранные пептиды были химически синтезированы и использованы для иммунизации кроликов. Все полученные сыворотки прошли процедуру аффинной очистки. Таким образом, были получены растворы специфичных к исследуемым каналам антител. Для оценки специфичности связывания был применен метод иммуноблоттинга.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-74-00137.

Д.Е. Сидорова¹, В.А. Плюта¹, И.А. Хмель¹.

ЛЕТУЧИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, ПРОДУЦИРУЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ВЛИЯНИЕ НА QUORUM SENSING СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ

¹ Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

D.E. Sidorova¹, V.A. Pluyta¹, I.A. Khmel¹.

VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS PRODUCED BY MICROORGANISMS: BIOLOGICAL ACTIVITY AND IMPACT ON QUORUM SENSING

¹ Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, Russia

misenok1@gmail.com

Синтез летучих органических соединений (ЛОС) — часто встречающееся свойство многих микроорганизмов.

Данные соединения играют важную роль в жизнедеятельности организмов, включая их межвидовое взаимодействие. ЛОС могут выступать как сигналы дистанционной коммуникации нового типа между различными организмами и влиять на Quorum Sensing (QS) системы регуляции. Как известно, QS участвуют в регуляции большого количества клеточных процессов, таких как формирование биопленок, вирулентность, продукция анти-микробных веществ и токсинов.

В настоящей работе продолжается изучение биологической активности ЛОС с разной химической структурой, синтезируемых бактериями разных таксономических групп: спирты (изоамиловый, 2-фенилэтанол), кетоны (2-бутанон, 2-пентанон, 2-октанон, бета-ионон — ненасыщенный кетон), терпены (лимонен и α -пинен). Объектами исследований являются: фитопатогенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, модельное растение *Arabidopsis thaliana*, плодовые мушки *Drosophila melanogaster*.

Также исследуется действие ЛОС на QS системы RhlI/RhlR, LasI/LasR и LuxI/LuxR типа с помощью специфических lux-биосенсоров *E. coli* JLD271/pAL101, *E. coli* JLD271/pAL105 и *E. coli* DH5 α /pSB401 соответственно.

По полученным данным ЛОС способны подавлять образование биопленок *A. tumefaciens* и убивать бактерии в зрелых биопленках, причем гибель бактерий, живущих в составе сформировавшихся биопленок, происходила при более высоких количествах ЛОС, чем при их образовании. Наибольшее ингибирующее действие на биопленки агробактерий оказывали 2-октанон, изоамиловый спирт и 2-фенилэтанол.

При действии на *A. thaliana* ЛОС тормозили прорастание семян и ингибировали рост зрелых растений, при этом утрачивалась их зеленая окраска. В присутствии 2-бутанона биомасса зрелых растений увеличивалась по сравнению с контролем без ЛОС.

Показано, что *D. melanogaster* погибали быстрее всего в присутствии лимонена и α -пинена, которые не проявляли такого явного действия с другими биологическими объектами. При увеличении количеств других ЛОС насекомые также погибали.

Обнаружено, что при количествах, не оказывающих значительного бактерицидного действия на клетки lux-биосенсоров, 2-фенилэтанол и 2-октанон осуществляли Quorum Quenching (QQ) у QS систем всех трёх типов (до 90%). 2-Бутанон стимулировал экспрессию системы RhlI/RhlR на 50% по сравнению с контролем (без ЛОС и аутоиндуктора), в сочетании с аутоиндуктором наблюдался синергический эффект их действия. 2-Бутанон не влиял на системы LasI/LasR и LuxI/LuxR типа.

Работа частично финансировалась грантом РФФИ № 18-04-00375-а.

Е.А. Слуцкая^{1,4}, Н.Н. Случанко^{2,3},
Е.Г. Максимов^{2,3}, А.В. Степанов¹

**ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ СЕНСОР ТЕМПЕРАТУРЫ,
ОСНОВАННЫЙ НА ФОТОАКТИВНОМ
ОРАНЖЕВОМ КАРОТИНОИДНОМ БЕЛКЕ**

¹ ФГБУН ИБХ им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва

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

³ Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Россия,
Москва

⁴ Российский университет дружбы народов, Россия,
Москва

E.A. Slutskaya^{1,4}, N.N. Sluchanko^{2,3},
E.G. Maksimov^{2,3}, A.V. Stepanov¹

**A GENETICALLY ENCODED FLUORESCENT
TEMPERATURE SENSOR DERIVED FROM THE
PHOTOACTIVE ORANGE CAROTENOID PROTEIN**

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Russian Academy of Sciences, Russia,
Moscow

² Lomonosov Moscow State University, Russia,
Moscow

³ A.N. Bach Institute of Biochemistry, Russia, Moscow

⁴ Peoples' Friendship University of Russia, Russia,
Moscow

slutskay@yandex.ru

Неоднородность метаболических реакций приводит к неравномерному распределению температуры в разных частях живой клетки. Для изучения нормального функционирования и патологических нарушений клеточных процессов необходима разработка новых методов визуализации, которые позволят легко интерпретировать данные, и не будут требовать введения синтетических красителей в клетку. Оранжевый каротиноидный белок (ОСР) с массой 35 кДа представляет собой небольшой водорастворимый фотозащитный белок цианобактерий, состоящий из двух структурных доменов с заключенной между ними молекулой кето-каротиноида. Константы скорости фотопреобразования и релаксации ОСР сильно зависят от температуры, а его третичная структура претерпевает значительные структурные перестройки при фотоактивации, что делает оранжевый каротиноидный белок функциональной частью генетически кодированного наноразмерного сенсора температуры. Мы конъюгировали зеленый и красный флуоресцентные белки (TagGFP и TagRFP) со структурой ОСР, создав фотоактивные химеры. В таких химерах электронное возбуждение флуоресцентного белка эффективно гасится каротиноидом в ОСР, что позволяет измерять скорости конверсии путем мониторинга изменений интенсивности флуоресценции. Такой подход позволил нам определить локальную температуру микросреды. Из-за высокой энергии активации релаксации ОСР (~ 32 ккал / моль), показания флуоресценции такого сенсора на основе ОСР могут потенциально обеспечить точность измерения температуры до 0,1 °С. Нами было показано, что фотоактивные химерные конструкции на основе ОСР и флуоресцентных белков чувствительны к температуре *in vitro*. После оптимизации химер и введения белковых частей для селективной доставки в определенные компартменты клетки, химеры на основе ОСР можно использовать для

измерения внутриклеточной температуры, специфичной для органелл и компартментов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №. 17-74-30019.

Д.В. Тихоненков

**(ФИЛО)ГЕНОМНЫЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНО-
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
НОВЫХ МАКРОТАКСОНОВ ГЕТЕРОТРОФНЫХ
ПРОТИСТОВ И ИХ ЭВОЛЮЦИОННАЯ
ВАЖНОСТЬ**

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина
Российской академии наук, Борок, Россия

D.V. Tikhonenkov

**(PHYLO)GENOMIC AND ULTRASTRUCTURAL
INVESTIGATIONS OF NEW HETEROTROPHIC
PROTISTS MACROTAXA AND THEIR
EVOLUTIONARY IMPORTANCE**

Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian
Academy of Sciences, Borok, Russia

tikho-denis@yandex.ru

В разнотипных водных экосистемах открыты и детально изучены на морфологическом и геномном уровнях новые для науки простейшие организмы, занимающие базальное, предковое филогенетическое положение в пределах суперкластеров эукариот. Исследования оказались важны для прояснения ряда эволюционных вопросов.

Происхождение многоклеточных животных.

Описаны новые виды простейших, предковых по отношению к многоклеточным животным. Обнаруженные протисты имеют сложный жизненный цикл, образуют многоклеточные агрегации и обладают необычным эукариотрофным питанием, а также имеют гены, кодирующие белки клеточных сигналов и адгезии, а также гены эмбрионального развития многоклеточных.

Происхождение фотосинтетических эукариот.

Открыт новый таксономический тип эукариот Rhodelphidia, являющийся сестринской эволюционной линией по отношению к красным водорослям. При этом, характеристики Rhodelphidia противоположны признакам красных водорослей. Они являются нефотосинтетическими жгутиконосцами-хищниками (поедают других протистов) с крупными геномами, а также реликтовой первичной пластидой, которая участвует только в биосинтезе гема.

Эволюция альвеолятных простейших и происхождение малярийных паразитов.

Выявлены и изучены два новых таксономических типа эукариот: Colponemidia и Acaomonidia внутри супергруппы Alveolata. Тип Acaomonidia — ближайший к предкам паразитических споровиков и динофлагеллят, тип Colponemidia — аналог предковой формы всех альвеолятных простейших (споровиков, динофлагеллят и инфузорий). Установлено, что сестринской группой к паразитическим споровикам является монофилетическая клада, названная нами «хромподеллиды», включающая хищных жгутиконосцев колподеллид и водоросли хромериды.

Древо эукариот и эволюция митохондриального генома. Описан жгутиконосец *Ancoracysta twisti*, не принадлежащий ни к одному из известных макротаксонов эукариот и представляющий собой новую

глубокую филогенетическую линию эволюционного древа. Митохондриальный геном *Ancoracysta* по числу генов самый крупный из известных науке после неродственных ей якобид и *Diphylleia*. Проведенный анализ митохондриальных генов *Ancoracysta* и других эукариот подчеркивает, что богатые генами митохондриальные геномы отнюдь не указывают на позицию организма вблизи корня эукариотического древа.

Были обнаружены несколько жгутиковых представителей новой филогенетической клады, которая вероятно не относится ни к одному из известных макротаксонов эукариот. Эти мельчайшие жгутиконосцы представляют слабо исследованную пико-фракцию одноклеточных эукариот в Мировом океане.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 20-34-70049 и № 20-04-00583) и в рамках государственного задания (тема № АААА-А18-118012690098-5).

Е.В. Фролова^{1,2}, Г.Г. Паскерова¹,
А.В. Смирнов¹, Е.С. Насонова^{2,1}

ЧЕТЫРЕ ГИПЕРПАЗИТА НА ОДНОГО ХОЗЯИНА: РАЗНООБРАЗИЕ СТРАТЕГИЙ РАЗВИТИЯ МЕЧНИКОВЕЛЛИД, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ КИШЕЧНЫХ ГРЕГАРИН ПОЛИХЕТЫ *PYGOSPIO ELEGANS*

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Кафедра зоологии беспозвоночных, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Лаборатория цитологии одноклеточных организмов, Санкт-Петербург, Россия

E.V. Frolova^{1,2}, G.G. Paskerova¹,
A.V. Smirnov¹, E.S. Nasonova^{2,1}

FOUR HYPERPARASITES IN THE SAME HOST: DIVERSITY OF DEVELOPMENT STRATEGIES OF METCHNIKOVELLIDS ISOLATED FROM THE INTESTINAL GREGARINES OF THE BRISTLE WORM *PYGOSPIO ELEGANS*

¹ Saint-Petersburg State University, Department of Invertebrate Zoology, Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Cytology RAS, Laboratory of Cytology of Unicellular Organisms, Saint Petersburg, Russia

uroborospora@gmail.com

Мечниковеллиды (Microsporidia: Metchnikovellidae) — гиперпаразиты грегаринов, обитающих в кишечнике морских беспозвоночных, преимущественно полихет. Для них характерен сложный жизненный цикл, включающий в себя два типа спорогонии, приводящих к образованию либо свободных, либо заключенных в толстостенные «споровые мешки» (цисты) спор. Форма и размер цист представляют собой видоспецифические признаки.

В кишечнике полихеты *Pygospio elegans* можно обнаружить два вида грегаринов: зугрегарины *Polyrhabdina* sp. и архигрегарины *Selenidium pygospionis*. *Polyrhabdina* sp. — хозяин первого порядка для *Metchnikovella incurvata* и *M. spiralis*. *B.S. pygospionis* паразитируют *M. dogieli* и еще не описанный вид *Metchnikovella* sp. Почти все стадии (в том числе, цисты и свободные споры) *M. incurvata* развиваются в непосредственном контакте с цитоплазмой хозяина. Согласно светомикроскопическим наблюдениям, вероятно, так же проходит жизненный цикл *M. dogieli*.

Цисты и свободные споры *M. spiralis* и *Metchnikovella* sp. развиваются в паразитофорных вакуолях (ПВ). При этом у *M. spiralis* ПВ, в которой лежит циста, увеличивает свой объем, приобретая поддерживающий ее изнутри каркас в виде шнура, спирально окружающего цисту. Происхождение ПВ не известно, так как не изучен процесс заражения грегаринов. Возможно, с помощью аппарата экстрезии мечниковеллиды заставляют плазмалемму грегарины инвагинировать в области микропоры, где отсутствуют внутренние мембраны пелликулы, тогда паразит оказывается заключенным в ПВ, произошедшую от плазмалеммы хозяина. Развитие паразитов в прямом контакте с цитоплазмой возможно в случае, если они могут с помощью аппарата экстрезии проделывать отверстие в пелликуле и инъецировать спороплазму прямо в цитоплазму грегарины.

Таким образом, мечниковеллиды используют две альтернативные стратегии: развитие цист и свободных спор в ПВ (иногда с увеличением ее объема), либо развитие в прямом контакте с цитоплазмой грегарины. В некоторых случаях, по-видимому, может происходить редукция ПВ на поздних этапах развития. Функциональное значение объемных паразитофорных вакуолей со зрелыми цистами или свободными спорами неясно. Заметим, что *M. incurvata* и *M. dogieli* производят настолько много спор и цист, что деформируют, полностью занимая цитоплазму, грегарины и, по мере накопления цист на разных стадиях, вызывают разрыв ее пелликулы. Такой плотности инвазии мы не наблюдали для видов, сохраняющих ПВ на большем протяжении их жизненного цикла, что может свидетельствовать о ее необходимости для полного созревания цист перед их выходом во внешнюю среду и поддержания целостности клетки хозяина до нужного момента. Суммируя вышесказанное, мечниковеллиды разных видов из одной полихеты обладают разными стратегиями выстраивания отношений с хозяином-грегариной.

Проект выполняется при поддержке гранта РФФИ № 18-04-01359.

О.А. Цаплина, Е.С. Божокина

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ M-HEL4 В ОТВЕТ НА ЗАРАЖЕНИЕ БАКТЕРИЯМИ

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

O.A. Tsaplina, E.S. Bozhokina

EXPRESSION VARIATION OF M-HEL4 SURFACE PROTEINS IN RESPONSE TO INFECTION BY BACTERIA

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

olga566@mail.ru

Для взаимодействия с окружающей средой клетки эукариот используют поверхностные рецепторы, с помощью которых патогенные и условно-патогенные бактерии могут проникать в клетки, которые в норме не фагоцитируют. Бактерии *Serratia proteamaculans* способны проникать в клетки эукариот, что коррелирует с активностью актин-специфической протеазы протеализин [1]. Среди субстратов протеализина был обнаружен белок внешней мембраны бактерий OmpX и показано, что трансформация *E.coli* плазмидой, несущей ген OmpX, в 3 раза увеличивает адгезию бактерий

к клеткам эукариот [2]. Поверхностный белок бактерий OmpX, взаимодействует с рецептором ЭФР и фибронектином [3, 4]. Фибронектин на поверхности клеток эукариот связывается с интегринами, гетеродимерными рецепторами, состоящими из $\alpha 5$ и $\beta 1$ субъединицы. Целью данной работы было проанализировать накопление клеточных белков, связывающихся с OmpX, в клетках HeLa в ответ на заражение бактериями *S. proteamaculans*. С помощью ОТ-ПЦР было показано, что при заражении бактериями *S. proteamaculans* экспрессия фибронектина и $\alpha 5$ -интегрин остается постоянной, а экспрессия $\beta 1$ -интегрин и рецептора ЭФР увеличивается в 2–2,5 раза. Заражение клеток контрольными *E. coli* не влияет на экспрессию этих белков в клетке-хозяине. Заражение клеток бактериями *E. coli*, трансформированными плазмидой, несущей ген OmpX, приводит к увеличению экспрессии $\beta 1$ -интегрин и рецептора ЭФР в 2,5–3 раза. Таким образом, заражение клеток HeLa инвазивными бактериями *S. proteamaculans* приводит к накоплению способных участвовать в инвазии рецепторов клетки-хозяина. Этот эффект может быть вызван взаимодействием OmpX с рецепторами клетки-хозяина.

Работа выполнена в рамках грантов РФФИ 19-74-00041, РФФИ 17-04-00558.

Литература:

1. Цаплина О.А., Ефремова Т.Н., Кевер Л.В. и др. Биохимия 2009; 74(6): 797–804.
2. Цаплина О.А. Цитология 2018. 60(10): 817–820.
3. Wiedemann A., Mijouin L., Ayoub M. A. et al. FASEB J. 2016; 30: 4180–91.
4. Tsang T. M., Felek S., Krukonis E.S. Infect Immun. V. 2010; 78: 3358–68.

**Е.А. Цой, Г.Ю. Фисун, Д.В. Евсютина,
И.А. Гаранина, В.А. Манувера, В.М. Говорун**
**БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ
ФАКТОР WHiA ОБРАЗУЕТ ПЕТЛЮ
ОБРАТНОЙ СВЯЗИ МЕЖДУ ТРАНСЛЯЦИЕЙ
И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИМ МЕТАБОЛИЗМОМ**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

**E.A. Tsoy, G.Y. Fisunov, D.V. Evsyutina,
I.A. Garanina, V.A. Manuvera, V.M. Govorun**
**BACTERIAL TRANSCRIPTION FACTOR WHiA
PROVIDES FEEDBACK LOOP BETWEEN
TRANSLATION AND ENERGY PRODUCTION**

Federal state budgetary institution "Federal research and clinical center of physical-chemical medicine Federal medical biological agency", Moscow, Russia

eatsoy2012@gmail.com

Ген *whiA* кодирует консервативный белок, распространенный среди бактерий. Он состоит из C-концевого НТН-домена, характерного для транскрипционных факторов, и N-концевого домена (HEN), гомологичного хоминг-эндонуклеазам.

WhiA важен для жизнедеятельности бактерий. Известно, что в разных бактериях он задействован в разных процессах. Например, у *Streptomyces spp* WhiA необходим для споруляции, а у *Bacillus subtilis* он участвует

в делении клеток и сегрегации хромосом. WhiA присутствует и в редуцированных бактериях класса Mollicutes, однако, его функция остается неясной. WhiA также входит в состав минимального генома, синтезированного группой Крейга Вентера.

Нами было сделано предположение, что консервативной мишенью WhiA является оперон, кодирующий рибосомные и ряд других белков (оперон *gpsJ*). Мы изучили функции гомологичных белков WhiA из *B. subtilis* и *Mycoplasma gallisepticum*. Мы доказали, что каждый из доменов WhiA связывает определенный мотив. Последовательность GAYACRCY (Y=C или T, R = A или G) является мишенью для НТН домена и важна для образования специфического ДНК-белкового комплекса, а HEN взаимодействует с дополнительным мотивом (GTTGT). На функционирование белков, относящихся к семейству WhiA, влияют концентрации макроэргов. Мы показали, что оба белка изменяют свое сродство к ДНК в присутствии как АТФ, так и АДФ.

Увеличение концентрации АТФ в *M. gallisepticum* приводит к конформационной перестройке белка, в результате чего происходит диссоциация HEN домена от ДНК. Мы показали, что WhiA из *M. gallisepticum* репрессирует транскрипцию оперона *gpsJ*, в ответ на снижение концентрации АТФ в клетке. Кроме того, этот белок может образовывать петли ДНК, связывая основную и дополнительные последовательности, между которыми находится несколько сотен оснований.

Л.А. Шмакова¹, С.А. Малявин¹, М.В. Молчанов²
**СОСТАВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
ОСМОЛИТОВ В КЛЕТКАХ ШТАММА
ACANTHAMOEBA SP. ИЗ ПЛЕЙСТОЦЕНОВОЙ
МЕРЗЛОТЫ ПО ДАННЫМ ЯМР-
СПЕКТРОСКОПИИ**

¹ Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН — обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия
² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

L.A. Shmakova¹, S.A. Malavin¹, M.V. Molchanov²
**COMPOSITION OF LOW MOLECULAR
WEIGHT OSMOLYTES IN THE CELLS
OF ACANTHAMOEBA SP. STRAIN FROM THE
PLEISTOCENE PERMAFROST ACCORDING
TO NMR SPECTROSCOPY**

¹ Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science RAS, Pushchino, Russia
² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Russia

shmakova@pbcas.ru

Накопление клеткой низкомолекулярных осмолитов является одним из ключевых компонентов адаптации к выживанию в отрицательных температурах. Мы исследовали состав водорастворимых осмолитов в клетках штамма акантамебы (*Acanthamoeba*, Амоевозоа), выделенного из отложений позднплейстоценовой вечной мерзлоты (пережившим в состоянии криптобиоза порядка 30 тысяч лет), методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Изучены ЯМР-спектры трофозоитов, незрелых цист, зрелых цист и псевдоцист.

В клетках идентифицировано несколько десятков водорастворимых метаболитов. В направлении

от трофозоитов к зрелым цистам наблюдается тотальное упрощение спектров: обеднение общего биохимического профиля и накопление трегалозы. В зрелых цистах трегалоза становится главным компонентом, и ее относительная концентрация возрастает в 75 раз. Концентрация ряда метаболитов повышается в начале инцистирования, но в зрелой цисте снижается ниже предела обнаружения метода. Это относится к таким метаболитам как уридин, триптофан, фенилаланин, тирозин, треонин, аспарагиновая кислота, глутамин, глутаминовая кислота, метионин, валин, изолейцин, лейцин.

Состав веществ, избирательно накапливаемых цистами и псевдоцистами, в значительной мере совпадает. Основным из них является трегалоза, концентрация которой увеличивается в несколько раз в псевдоцистах и на два порядка в цистах. В то же время, наблюдаются и минорные изменения концентрации некоторых веществ, некоторые из которых известны как участвующие в клеточном ответе на низкие температуры (например, холин). Сравнение спектров псевдоцист и цист демонстрирует более глубокий характер физиологических процессов, происходящих при формировании последних. Этим объясняется и большая устойчивость цист к различного рода воздействиям, отмеченная как в литературе, так и в наших наблюдениях.

Как и при инцистировании, при образовании псевдоцист снижается содержание большинства аминокислот и углеводов, при этом происходит накопление трегалозы, холина и α -глицерофосфохолина. В отличие от цист, при образовании псевдоцист наблюдалось накопление фумарата и уроканата. Последний в случае с цистами обнаружен на стадии незрелой цисты, но отсутствовал в зрелых цистах.

Работа выполнена в рамках госзадания № 0191-2019-0044 и поддержана грантом РФФИ № 18-04-00824.

Ю.А. Яковлева¹, Е.С. Насонова^{1,2},
Н.А. Лебедева¹, А.А. Потехин¹, А.Э. Вишняков¹,
Н.И. Бондаренко¹, Е.В. Сабанеева¹

МИКРОСПОРИДИИ ИНФУЗОРИЙ РОДА PARAMECIUM

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

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Yu.A. Yakolveva¹, E.S. Nasonova^{1,2},
N.A. Lebedeva¹, A.A. Potekhin¹, A.E. Vishnyakov¹,
N.I. Bondarenko¹, E.V. Sabaneyeva¹

MICROSPORIIDIAN PARASITES OF PARAMECIUM

¹ Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

st041958@student.spbu.ru

Микроспоридии являются облигатными внутриклеточными паразитами с широким кругом хозяев, однако они чрезвычайно редко встречаются у инфузорий, и до последнего времени не были известны у представителей рода *Paramecium*. Нами впервые выделено два вида микроспоридий, паразитирующих у парамеций: *Globosporidium paramecii* из инфузории *P. primaurelia* (клон SpM5-3, изолирован в Испании, 2015)

и *Globosporidium sp.* из *P. sonneborni* (клон CyP5-13, первый клон данного вида, несущий какого-либо эндосимбионта, изолирован на Кипре, 2016). Оба паразита на стадии споры обладают короткой полярной трубкой, двухчастным поляропластом и выраженной задней вакуолью, но отличаются по своей форме: *G. paramecii* имеет сферическую форму, *Globosporidium sp.* — бокаловидную. В отличие от *G. paramecii*, у споры *Globosporidium sp.* не выявлено двух отличающихся по размеру типов спор. С помощью световой и электронной микроскопии было показано, что в цитоплазме инфузорий одновременно присутствуют все стадии жизненного цикла: меронты, споронты и споры одноядерные, спорогональные плазмодии многоядерные.

Последовательности генов рРНК малой субъединицы рибосомы паразитов имеют высокий процент сходства (98.4%), однако микроспоридии отличаются друг от друга как морфологически, так и специфичностью к разным видам хозяев, что позволяет отнести этих микроспоридий к разным видам в пределах рода *Globosporidium*. Филогенетический анализ продемонстрировал близость рода *Globosporidium* к микроспоридиям из низших ракообразных, личинок комаров, инфузорий.

Получены первые сведения о геноме *G. paramecii*. Выделена тотальная ДНК из микроспоридий, извлеченных из цитоплазмы инфузории с помощью микроманипулятора, проведена полногеномная амплификация и подготовлены библиотеки парных ридов. Отобрано 696 контигов, принадлежащих паразиту; в них предсказано 1173 потенциальных гена, которые будут использованы в дальнейшем анализе.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 18-04-00562 и РФФИ 19-74-20136 с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ: «Культивирование микроорганизмов», «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Биобанк», «Вычислительный центр».

СОДЕРЖАНИЕ

12 ОКТЯБРЯ 2020

БИОЛОГИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

О.Ю. Алексеева, П.И. Бобылёва, Е.Р. Андреева

Активность внутриклеточных органелл и содержание активных форм кислорода в макрофагах при взаимодействии с мезенхимальными стромальными клетками 5

С.А. Антонов, Р.В. Тимошенко, Ю.С. Иванова, А.В. Бородкина, О.Г. Люблинская

Изменение уровня внутриклеточной перекиси водорода в культурах эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека при стресс-индуцированном и репликативном старении 5

Н.А. Басалова, М.В. Балабан, А.О. Монакова, Г.Д. Сагарадзе, В.С. Попов, А.Ю. Ефименко

Фенотипическая пластичность клеток сперматогенной ниши в культуре *in vitro* 6

А.В. Беляев, Т.Ю. Старкова, А.Н. Томилин

Негистоновый белок hmtgβ3 в хроматине эмбриональных стволовых клеток мыши 6

А.В. Бородкина, П.И. Дерябин, А.А. Грюкова, А.Н. Шатрова, А.П. Домнина, И.В. Горелова, М.В. Рулев, Н.Н. Никольский

Накопление стареющих стромальных клеток обуславливает дисфункцию эндометрия 7

М.А. Бутолина, К.А. Ветошкин, Е.А. Перфилова, Е.Н. Калинина, М.В. Сарпова, И.А. Новоселова

Изучение биораспределения меченых мезенхимальных клеток стромы костного мозга у лабораторных животных 7

Ю.Д. Василец, К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева, А.В. Комова, И.Б. Белоглазова, Е.И. Ратнер, Е.В. Парфенова

Трансформирующий фактор роста (tgf-β) участвует в регуляции сборки 3d кардиальных сфероидов 8

Е.В. Викторова, Д.Г. Коровина

Жировая ткань овцы как источник мультипотентных мезенхимных стволовых клеток 9

Е.С. Войнова, П.А. Тюрин-Кузьмин

Гормональная регуляция и пролиферативно-дифференцировочный потенциал мезенхимных стромальных клеток при их старении 9

И.Н. Воропаев, С.В. Пономарцев, М.Н. Гордеев, Е.В. Потапенко, А.Н. Томилин.

Обеспечение гиперэкспрессии гена человеческого лейкоцитарного антигена g (*hla-g*) ипс клетках мыши гемофильного фенотипа с альфоидной искусственной хромосомой человека, содержащей ген фактора свертывания крови 8 (*fVIII*) 10

С.О. Генинг, Т.В. Абакумова, Д.Р. Долгова, А.А. Ризванов, И.И. Антонеева, Д.У. Гафурбаева, А.Р. Рахматуллина

Гетерогенность фенотипа циркулирующих опухолевых клеток у больных раком яичников ... 10

П.А. Голубинская, М.В. Сарычева, М.В. Пузанов, Ю.Е. Бурда

Применение секретомы стволовых клеток в лечении адьювантного артрита, эндотоксического шока и кожного заболевания на животных моделях 11

М.Н. Гордеев, Е.И. Бахмет, А.А. Кузмин, А.Н. Томилин

Создание репортерных линий эмбриональных стволовых клеток для изучения процесса ранней дифференцировки 11

Ю.С. Гречаная, Т.В. Машель, К.Э. Журенков, Ю.И. Хорольская, О.И. Александрова

Стволовые клетки роговичного лимба и слизистой ротовой полости в условиях 3d культивирования в коллагеновом гидрогеле 12

А.А. Грюкова, П.И. Дерябин, А.Н. Шатрова, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис, А.В. Бородкина

Роль hsp70 в выживаемости старых эндометриальных стромальных клеток 12

П.И. Дерябин, А.А. Грюкова, А.Н. Шатрова, А.П. Домнина, И.В. Горелова, М.В. Рулев, А.В. Бородкина

Отрицательная зависимость между состоянием старения и способностью дифференцироваться эндометриальных мезенхимальных стромальных клеток человека . 13

Н.В. Едоменко, О.И. Александрова, М.И. Блинова

Стволовые клетки эпидермиса как компонент биоинженерной конструкции для реэпителизации кожи 13

А.Ю. Ефименко, Н.А. Басалова, А.Г. Сорокина, Е.С. Новоселецкая, О.А. Григорьева, Н.А. Александрюшкина, М.С. Арбатский, П.А. Тюрин-Кузьмин, К.Ю. Кулебякин, Н.И. Калинина, Я.А. Орлова, В.А. Ткачук

Мезенхимные стромальные клетки как регуляторы процессов репарации и регенерации тканей: вклад некодирующих рнк в секретоме клеток 14

<i>Н.А. Жигалова, С.В. Женило</i> Kaiso является маркером отдельных популяций стволовых клеток кожи	15	<i>Ю.П. Новикова, Э.Н. Григорян</i> Ремоделирование сетчатки глаза в условиях органотипического культивирования <i>in vitro</i> и при повреждении сетчатки <i>in vivo</i> у низших и высших позвоночных животных	20
<i>К.Э. Журенков, Б.Д. Бабков, М.С. Сердобинцев, С.А. Александрова, О.И. Александрова, М.И. Блинова</i> Морфологические аспекты костной регенерации после пластики дефекта тканеинженерной конструкцией	15	<i>Е.С. Новоселецкая, Г.Д. Сагарадзе, Н.А. Басалова, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко</i> Поддержание фенотипа стволовых клеток при культивировании на внеклеточном матриксе, продуцируемом мезенхимными стромальными клетками	21
<i>И.В. Зубарев, С.А. Синенко, С.В. Пономарцев, У.И. Поденкова, А.Р. Газизова, А.Н. Томилин, А.С. Цимоха, Т.И. Зюбко</i> Участие иммунопротеасом в процессе генетического репрограммирования мышечных эмбриональных фибробластов в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки	16	<i>Е.С. Новоселецкая, О.А. Григорьева, И.Г. Миловская, К.Ю. Кулебякин, М.А. Кулебякина, П.П. Нимирицкий, П.И. Макаревич, В.А. Ткачук, А.Ю. Ефименко</i> Механизмы регуляции дифференцировки стволовых клеток компонентами внеклеточного матрикса, продуцируемого мезенхимными стромальными клетками	22
<i>Ю.С. Иванова, О.Г. Люблинская, Н.А. Пуговкина, И.Э. Неганова, Н.Н. Никольский</i> Биосенсор перекиси водорода <i>hureg</i> как инструмент для изучения редокс-регуляции процесса клеточного репрограммирования в плюрипотентное состояние	16	<i>Ч.К. Нуриева, Е.А. Науменко, Е.В. Рожина, Е.Ю. Закирова, Ф.С. Ахатова, И.Д. Гурьянов, Р.Ф. Фахруллин</i> Культивирование трёхмерных клеточных моделей печени	22
<i>И.Р. Ишмухаметов, Ф.С. Ахатова, Э.В. Рожина, Р.Н. Мингалеева, Р.Ф. Фахруллин</i> Разработка модифицированных подложек для стимуляции адипогенеза мезенхимальных стволовых клеток	17	<i>А.В. Панова, М.В. Черноруцкий, Н.В. Костюк, М.Б. Белякова</i> Оценка возможности использования эксплантов разных тканей для получения культуры хондробластов	23
<i>А.В. Комова, К.В. Дергилев, З.И. Цоколаева, Ю.Д. Василец, Е.С. Зубкова, И.Б. Белоглазова, Е.И. Ратнер, Е.В. Парфенова</i> Тромбоцитарный фактор роста (pdgf-bb) регулирует пролиферативные и миграционные свойства клеток эпикарда мыши	17	<i>Д.А. Переплетчикова, Ю.И. Хорольская, К.Э. Журенков, О.И. Александрова</i> Лимбальные стволовые клетки как модельная тест-система для оценки влияния местной фармакотерапии на клеточную составляющую тканеинженерных конструкций роговицы	23
<i>Н.С. Кулишкин, Г.П. Маслаков, А.А. Суркова, М.А. Кулакова</i> Зачем ооцитам транскрипты дифференцировочных генов?	18	<i>У.И. Поденкова, Е.И. Бахмет, Т.И. Зюбко, И.В. Зубарев, А.Н. Томилин, А.С. Цимоха</i> Экспрессия генов иммунопротеасом наблюдается в дифференцировке эмбриональных стволовых клеток мыши из наивного в праймированное состояние	24
<i>П.И. Макаревич, Р.Ю. Еремичев, Н.А. Александровская, П.П. Нимирицкий, М.С. Арбатский, А.Ю. Ефименко, В.А. Ткачук</i> Роль стромальных клеток в координации постнатального морфогенеза	19	<i>А.Н. Поджилкова, В.Г. Шуватова, Ю.П. Семочкина, Г.А. Посыпанова</i> Исследование чувствительности 3d-культуры <i>msc7</i> , обогащенной опухолевыми стволовыми клетками, к доцетакселу и ионизирующему излучению	24
<i>Д.К. Матвеева, Е.Р. Андреева</i> Рецеллюляризация внеклеточных матриксов от мск, культивируемых при различном уровне O_2	19	<i>А.В. Полянская, Д.Ф. Гончарова, А.С. Мусорина, Г.Г. Полянская, Д.Е. Бобков</i> Анализ ядерно-цитоплазматического перераспределения α -актина-4 и ρ hoa в процессе репликативного старения мск жировой ткани человека	25
<i>А.О. Монакова, Н.А. Басалова, М.В. Балабан, Г.Д. Сагарадзе, В.С. Попов, А.Ю. Ефименко</i> Установление механизмов восстановления ниши сперматогонимальной стволовой клетки с помощью секрета мезенхимных стромальных клеток	20		

<i>А.Н. Попова, О.С. Роговая, А.С. Артюхов, Н.А. Евтушенко, А.В. Васильев, Е.А. Воротеляк</i> Влияние криохранения на популяцию стволовых клеток в культуре кератиноцитов человека	25	<i>Л.А. Сафиуллина, Е.Д. Порохова, Е.С. Мелашенко, И.К. Норкин, Е.О. Шунькин</i> Влияние т-клеток на остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток in vitro	31
<i>Е.Д. Порохова, Л.А. Сафиуллина, Е.О. Шунькин, К.А. Юрова</i> Связь цитокинов и хемокинов с морфологией и минерализующим потенциалом стромальной фракции мононуклеарных лейкоцитов крови человека	26	<i>Д.Н. Силачѳв, В.В. Головичева, Т.И. Данилина, Ю.А. Шевцова, К.В. Горюнов, В.А. Бабенко, Е.Ю. Плотников, Е.А. Туровский, В.П. Зинченко, Д.Б. Зоров</i> Терапевтическое применение стволовых клеток и внеклеточных везикул: можно ли поставить знак равенства?	32
<i>А.Ю. Ратушный, М.И. Ездакова</i> Ангиогенный потенциал мезенхимальных стромальных клеток при репликативном старении	27	<i>Т.Ю. Старкова, С.В. Пономарцев, Е.В. Чихиржина, А.Н. Томилин</i> Роль негистоновых белков хроматина hmgб1 и hmgб2 в поддержании плюрипотентности и дифференцировке эмбриональных стволовых клеток мыши	32
<i>М.Г. Ратушняк, Ю.П. Семочкина</i> Повышение выживаемости облученных нейральных стволовых клеток мыши с помощью факторов, секретируемых необлученными нейральными стволовыми клетками и мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани	27	<i>А.К. Степанюгина, Н.Г. Плехова</i> Прооксидантное действие перспективного препарата для фотодинамической терапии хлорофилла оху	33
<i>А.В. Ревитцер, Ю.А. Негуляев</i> Исследование перестроек фибриллярного актина в мезенхимных стволовых клетках с помощью фрактальной размерности минковского	28	<i>Р.Е. Ушаков, М.А. Витте, Е.В. Скворцова, Е.Б. Бурова</i> Хондрогенная дифференцировка мезенхимных стволовых клеток эндометрия человека как результат нокаута igfbr3	33
<i>Д.П. Ревокатова, А.А. Горкун, И.М. Зурина, Д.А. Никишин, Н.В. Кошелева, Е.Е. Устинова, Т.Д. Колокольцова, И.Н. Сабурина</i> Остеогенез и ангиогенез в сфероидах из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека	28	<i>Д.А. Федотов, Е.С. Новоселецкая, Г.Д. Сагарадзе, Н.А. Басалова, Н.А. Александрушкина, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко</i> Внеклеточный матрикс как компонент ассоциированного со старением секреторного фенотипа сенесцентных мезенхимных стромальных клеток	34
<i>Э.В. Рожина, И.Р. Ишмухаметов, А.О. Рожин, Ф.С. Ахатова, Р.Н. Мингалеева, Р.Ф. Фахруллин</i> Подложки с наноразмерной топографией на основе магнитных наноматериалов и полимеров для дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток	29	<i>Г.А. Фурса, А.Д. Воронова, О.В. Степанова, Е.К. Карсунцева, М.П. Валихов, А.В. Чадин, Д.А. Вишневецкий, И.В. Решетов, В.П. Чехонин</i> Методологические особенности получения адгезивной культуры нейральных стволовых прогениторных клеток обонятельной выстилки крыс для терапии экспериментальных кист спинного мозга	34
<i>А.А. Рябинин, Е.П. Калабушева, Е.А. Воротеляк</i> Разработка технологий генерации аутологичных эквивалентов и дериватов кожи из плюрипотентных клеток	29	<i>Т.С. Хабалова, Г.В. Селедцова</i> Влияние трансплантации микровезикул, полученных из разных клеточных линий, на морфологические показатели в моделях хронической и острой почечной недостаточности мышей	35
<i>А.П. Савельева, О.А. Быстрова, М.Г. Мартынова, Е.В. Байдюк, И.Э. Неганова</i> Роль аутофагии при преодолении клеточного старения мскч в 3d-2d модели	30	<i>А.С. Чабина, И.В. Воронкина, Ю.А. Нащеккина</i> Определение влияния аргининовой модификации поли-ε-капролактоновых пленок на синтез белков внеклеточного матрикса мезенхимальными стромальными клетками	36
<i>М.М. Савина, С.В. Пономарцев, И.Н. Воропаев, А.Н. Томилин</i> Характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши, несущих альфоидную ^{tetO} искусственную хромосому с геном фактора свѳртываемости крови 8 (fviii) человека	31		

<i>И.Н. Черненко, Н.Г. Плехова</i> Дендритные клетки как потенциальные объекты для разработки противовирусной вакцины	36	<i>А.А. Баталова, Д.А. Белинская, Н.В. Гончаров</i> Взаимодействие параоксона с альбуминами человека и быка с различной степенью окисления cys34: сравнительный анализ методами молекулярного моделирования	42
<i>М.Н. Чиркова, А.М. Аймалетдинов, Е.Ю. Закирова</i> Иммунофенотипический профиль и дифференцировочные возможности мезенхимальных стволовых клеток адипогенного происхождения лошади при культивировании <i>in vitro</i>	37	<i>Э.Х. Бекназарова, В.А. Глушников, И.А. Беляева</i> Подходы к компьютерному моделированию процесса воздействия импульсного магнитного поля высокой напряженности на биологическую клетку	43
<i>С.Ф. Шайхулова, Ф.С. Ахатова, Е.А. Науменко, Е.Ю. Закирова, И.Д. Гурьянов, Р.Ф. Фахруллин</i> Анализ механических характеристик стволовых клеток разных видов животных при помощи атомно-силовой микроскопии	37	<i>И.Е. Борисенко, М.А. Даугавет, О.И. Подгорная, А.В. Ересковский</i> Новый мажорный белок жгутиковых клеток личинки губки оказался консервативным: структура, эволюция, экспрессия и предполагаемые функции	43
<i>А.Ю. Шалаева, В.В. Козин</i> Участие факторов роста фибробластов и таркиназного пути в контроле над пролиферацией у аннелиды <i>alitta virens</i>	38	<i>А.Н. Бызова, Ю.А. Нащекина</i> Скаффолды на основе природных и синтетических полимеров, полученные методом лиофильной сушки	44
<i>М.М. Шаматова, А.В. Сударикова, Ю.А. Негуляев</i> Функциональная активность электровозбудимых натриевых каналов в клетках линии к562 и мезенхимных стволовых клетках человека	38	<i>М.А. Васильченко-Базарова, А.А. Жарикова, А.А. Валяева, Д.М. Поташникова, М.А. Тихомирова, Я.Р. Мусинова, Е.В. Шеваль</i> Влияние индуцибельной и стабильной экспрессии ТАТ белка вируса иммунодефицита человека на экспрессию клеточных генов в культивируемых лимфоцитах RPMI 8866	44
<i>О.О. Шошина, П.М. Кожин, А.Л. Русанов, Н.Г. Лузгина</i> Первичная оценка различных параметров поляризации мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани	39	<i>Д.А. Горбенко, Д.Д. Недорезова, М.Д. Рубель, Д.М. Колпациков</i> Визуальная детекция бактериальных патогенов с использованием пероксидазо-подобных дезоксирибозимов	45

12 ОКТЯБРЯ 2020

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

<i>Е.С. Авдеева, Т.Е. Пылаев, Ю.М. Ефремов, А.А. Антошин, П.С. Тимашев, Н.Г. Хлебцов</i> Механические свойства клеток <i>hela</i> при лазерной трансфекции на слоях золотых наночастиц	40	<i>Д.А. Горбенко, А.В. Белашов, Т.Н. Беляева, И.К. Литвинов, Е.С. Корнилова, И.В. Семёнова, О.С. Васютинский</i> Мониторинг динамики гибели клеток, вызванной ррих, методом голографической томографической микроскопии	46
<i>А.Д. Акименкова, А.И. Марахова</i> Факторы, влияющие на синтез наночастиц серебра с помощью экстаков растений	40	<i>А.И. Гудович, Е.Ю. Смирнов, А.А. Дакс, А.И. Кизенко, Н.А. Барлев, О.А. Федорова</i> Подавление экспрессии e3-убиквитинлигазы <i>pirh2</i> ведет к снижению чувствительности клеток рака молочной железы к ингибиторам <i>her2</i>	46
<i>Ю.А. Антифеева, А.В. Фонин, О.И. Поварова, М.М. Карасев, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов</i> Комплексная коацервация протимозина альфа и линкерного гистона n1 при различных значениях рн	41	<i>М.М. Гузенко, М.Ю. Сироткина, В.В. Васильева, Д.М. Дарвиш</i> Инъекционные формы коллагеновых гелей и их модификация с целью увеличения влагодерживающей способности	47
<i>Л.С. Бадма-Халгаева, А.А. Захарова, С.С. Ефимова, З.М. Саркисян, О.С. Остроумова</i> Влияние нортангеретина на физико-химические свойства модельных липидных мембран	42	<i>М.А. Даниэль, Д.А. Романова, Е.В. Писарева, Е.В. Тимченко, М.Ю. Власов</i> Физико-химические изменения костной ткани в условиях моделирования стероид-индуцированной резорбции и введения минерального костного компонента	47

- Ю.Д. Диордиенко, Н.М. Мельникова, М.И. Сулацкий, А.И. Сулацкая*
Индукция фибриллогенеза лизоцима с использованием температурной и химической денатурации 48
- Е.Е. Дьяконов, Т.О. Артамонова, М.А. Ходорковский, А.С. Цимоха.*
Поиск специфических для внеклеточных протеасом пост-трансляционных модификаций . 48
- Л.М. Забегина, С.Е. Титов, М.К. Иванов, И.В. Назарова, А.В. Малек.*
МикроРНК из tpo(+) экзосом — потенциальный маркер для дифференцировки злокачественных и доброкачественных форм фолликулярных опухолей щитовидной железы .. 49
- А.А. Захарова, Т.Е. Тертычная, С.С. Ефимова, О.С. Остроумова*
Зависимость порообразующей активности антимикробных пептидов от толщины модельных липидных мембран 50
- А.А. Иванова, Е.Ю. Симоненко, В.В. Прядун, А.Г. Миронова, А.Н. Васильев*
Изменение термодинамических характеристик криопротектора на основе водно-глицеринового раствора после добавления отдельных компонент 50
- А.Р. Ильина, В.П. Октябрьский, Л.Т. Рязанцева*
Парниковый эффект и генетическая активность человека 51
- Л.С. Ключова*
Высокопроизводительный фенотипический скрининг потенциальных лекарственных соединений для изучения модуляторных эффектов, оказываемых на ферменты цитохромар450 51
- О.А. Колесникова, В.О. Шипунова, В.Д. Соловьев, С.М. Деев*
Получение и характеристика магнитных наночастиц для адресной доставки к her2–положительным раковым клеткам 52
- В.А. Консон, Ю.А. Нащёкина*
Модифицированные альгинатные гели для культивирования клеток 52
- П.А. Котельникова, В.О. Шипунова, С.М. Деев*
Многофункциональные агенты на основе серебряных наночастиц 53
- А.В. Кривошей, В.И. Бархатов, А.А. Ефремов, Е.К. Матвейшина, П.В. Вржещ*
Отрицательная кооперативность при связывании субстрата (арахидоновой кислоты) и обратимых ингибиторов с димерным ферментом простагландин-*h*-синтазой 53
- Л.В. Крылова, Н.Н. Пескова, А.Б. Воловецкий, С.Ю. Пронина, В.Ф. Отвагин, Н.С. Кузьмина, А.Ю. Федоров, И.В. Балалаева*
Исследование противоопухолевой активности конъюгата хлорина *e6* с вандетанибом как агента для комбинированной фотодинамической и таргетной терапии 54
- А.Е. Кулешова, Л.В. Пурвиньш, Е.Е. Буркова, С.Е. Седых, Г.А. Невинский*
Изучение нуклеиновых кислот экзосом молока .. 54
- В.А. Куликова, А.В. Кропотов, К.Б. Неринский, А.П. Якимов, С.П. Гамбарян, Ю.С. Судницына, М.П. Светлова, Л.В. Соловьева, А.А. Никифоров*
Импорт и метаболизм нуклеозидных форм витамина *b3* клетками человека 55
- Т.А. Кургина, М.М. Кутузов, К.А. Белоусова, Р.О. Анарбаев, С.Н. Ходырева, О.И. Лаврик*
Исследование взаимодействия ферментов *ragr1* и *ragr2* с повреждениями днк в контексте нуклеосом 55
- В.Н. Лавренова, Е.Н. Графская, Д.А. Широков, П.А. Бобровский, А.М. Белова, И.А. Лацис, В.Ю. Варламова, М.А. Дмитриева, В.В. Бабенко, В.А. Манувера, В.Н. Лазарев*
Получение и свойства новых антистазин-подобных белков медицинской пивавки 56
- И.К. Литвинов, Т.Н. Беляева, Е.А. Леонтьева, А.О. Орлова, Е.С. Корнилова*
Исследование взаимодействия безкадмиевых нетаргетных кт на основе фосфида индия с клетками линии *a549* 57
- Д.В. Лысикова, В.Ю. Васильева, В.И. Чубинский-Надеждин, Ю.А. Негуляев, Е.А. Морачевская, А.В. Сударикова*
Функционально-активный канал *enac* в мембране клеток *k562* содержит σ -субъединицу 57
- И.С. Малахов, И.В. Смирнов, О.А. Шашкова, С.В. Шатик, Л.А. Терехина, Н.Л. Вартамян, М.П. Самойлович*
Антигенсвязывающая способность и эффективность меченых радионуклидами моноклонального антитела против эндоглина в зависимости от его константного участка 58
- Н.М. Мельникова, Ю.Д. Диордиенко, М.И. Сулацкий, А.И. Сулацкая*
Сравнительное изучение структуры амилоидных фибрилл на основе бета-амилоидов с различной длиной аминокислотной последовательности 59
- Е.Д. Милешина, О.В. Серова, А.С. Горященко, А.А. Ганцова, А.А. Можаяев, И.Е. Деев, А.Г. Петренко*
Получение и иммунохимическая характеристика поликлональных антител к рецепторной тирозинкиназе *irr* 59

<i>А.А. Нижников</i> Биологические роли и патологические последствия амилоидогенеза у прокариот и эукариот	60	<i>А.О. Травина, Н.В. Ильичева, С.В. Шабельников, А.Г. Миттенберг, О.И. Подгорная</i> Взаимодействие линкерной области UDTRF2 теломер-связывающего белка TRF2 с представителями семейства промежуточных филаментов и семейства протеин-дисульфид-изомераз	66
<i>К.Г. Павлова, Н.Ю. Шилягина, А.Б. Воловецкий, А.Б. Костюк, А.Г. Орлова</i> Оценка уровня оксигенации новообразований методами оптической диффузионной спектроскопии и иммуногистохимии	60	<i>Н.А. Трусова, А.И. Лихачев, Ю.А. Нащекина</i> Способы физической и химической фиксации геля на основе коллагена I типа	66
<i>Н.Н. Пескова, А.А. Горохова, Н.Ю. Шилягина, А.Б. Костюк, С.А. Лермонтова, Л.Г. Клапшина, А.А. Брилкина, И.В. Балалаева</i> Вторичная продукция пероксида водорода и изменение вязкости опухолевых клеток в ответ на фотодинамическое воздействие	61	<i>Г.Е. Филонова, Д.С. Каплун, Ф.С. Шарко, А.М. Мазур, Е.Б. Прохорчук, С.В. Женило</i> Создание и характеристика модельной системы с выключенной метил-днк связывающей активностью <i>kaiso</i>	67
<i>О.А. Ракитина, М.В. Зиновьева, Д.А. Дидыч, В.К. Потапов, А.И. Кузьмич</i> Изучение эффективности нацеленного на опухолевую строму гистонового носителя плазмидной днк	62	<i>Д.А. Халенёва, С.С. Ефимова, Е.В. Литасова, Л.Б. Пиотровский, О.С. Остроумова</i> Влияние водорастворимых комплексов фуллерена с гексометонием на модельные липидные мембраны	67
<i>Е.С. Селиверстов, Е.В. Зубарева, С.В. Надеждин</i> Влияние статического магнитного поля на клетки <i>hela</i> при разном времени экспозиции ..	62	<i>Ш.И. Чалабов, Е.П. Шуколюкова, М.А. Чеботарева, С.А. Забелинский, Е.Р. Никитина, Н.К. Кличханов, А.И. Кривченко</i> Фосфолипиды эритроцитов сусликов при гибернации	68
<i>А.Ю. Сидоров, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, А.С. Терентьев</i> Получение конформеров <i>fc</i> фрагментов <i>igg</i> человека, несущих неозепитопы, распознаваемые регуляторным ревматоидным фактором, при помощи иммобилизованного тиолсодержащего белкового комплекса	63	<i>А.А. Чепанова, Н.С. Ли-Жуланов, Т.А. Кургина, А.Л. Захаренко, О.Д. Захарова, К.П. Волчо, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Лаврик</i> Разработка ингибиторов <i>tdp1</i> на основе производных хроменов как потенциальных противораковых препаратов	68
<i>В.Ф. Смирнова, И.О. Гаврилюк, Д.М. Дарвиш, М.Ю. Сироткина, С.В. Чурашов, О.И. Александрова, В.Ф. Черныш, М.И. Блинова, А.Н. Куликов</i> Исследование биodeградации коллагенсодержащих гелей	63	<i>Е.В. Чепелева, И.Г. Мухина, Е.С. Видулова, А.А. Жеравин</i> Исследование <i>in vitro</i> цитотоксичности новых имплантатов для реконструктивной онкохирургии на основе никелида титата с модифицированной поверхностью	69
<i>А.С. Согомонян, В.О. Шипунова, С.М. Деев</i> Биоразлагаемые полимерные наноагенты как средства доставки к <i>her2</i> -сверхэкспрессирующим раковым клеткам	64	<i>Ю.О. Чернов, А.А. Рубель, Л.М. Джей-Гарсия, З. Декнер, А.В. Гризель, А.А. Зелинский, А.Е. Зобнина, Д.В. Качкин, К.Ю. Куличихин, О.А. Маликова, Т.А. Чернова</i> Роль агрегации белков в наследственности, клеточной памяти и заболеваниях	69
<i>М.И. Сулацкий, О.И. Поварова, А.И. Сулацкая</i> Влияние флуоресцентных зондов на зрелые амилоидные фибриллы	64	<i>Д.Н. Чернышова, С.С. Ефимова, З.М. Саркисян, П. Бремонд, О.С. Остроумова</i> Влияние циклогексил-производных <i>o</i> -имино-изомочевины на физико-химические свойства модельных липидных мембран	70
<i>И.Н. Тертеров, И.А. Поздняков</i> Координация ионов вокруг карбоксильных групп в селективных фильтрах эукариотических потенциал-управляемых натриевых и кальциевых каналов	65	<i>Е.В. Шекунов, С.С. Ефимова, А.А. Чистов, В.А. Коршун, А.В. Устинов, О.С. Остроумова</i> Мембранная активность ингибиторов вирусного слияния периленового ряда	70

- И.Г. Шерстнёв, О.И. Поварова, Д.С. Поляков, Р.Г. Сахабеев, М.И. Сулацкий, А.И. Сулацкая*
Влияние pH раствора на структуру амилоидных фибрилл на основе бета-2-микроглобулина 71
- В.О. Шипунова, С.М. Деев*
На пути к созданию волшебной пули — многофункциональные наноагенты для тераностики 72
- М.Ю. Шубина, Е.А. Арифудин, Д.В. Сорокин, М.А. Сосина, М.А. Тихомирова, М.В. Серебрякова, Т. Смирнова, С.С. Соколов, Я.Р. Мусинова, Е.В. Шеваль*
Gap-домен обеспечивает правильное позиционирование фибрилларина в пространстве эукариотической клетки 73
- Л.С. Шуйский, В.Ю. Васильева*
Исследование эффектов моделирования гипергликемии на депо-управляемый вход кальция в подоцитах 73
- С.А. Шумейко, А.Г. Бобылёв, Э.И. Якупова, И.М. Вихлянцев, Л.Г. Бобылёва*
Исследование структуры амилоидо-подобных агрегатов миозин-связывающего белка с 74
- 13 ОКТЯБРЯ 2020**
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТочНЫЕ ОСНОВЫ ПАТОЛОГИИ
- А.И. Алексеева, А.С. Халанский, С.Ф. Дрозд, Н.С. Осипова, С.Э. Гельперина, Г.В. Павлова*
Сравнительная генетическая характеристика экспериментальных моделей глиобластомы: 101/8 и с6 75
- В.В. Алифанов, А.В. Бузенкова, О.Е. Савельева, Л.А. Таширева*
Опухолевые клетки инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа гетерогенны по признакам стволовости и эпителиально-мезенхимального перехода 75
- А.С. Альдекеева, Ю.С. Крайнова*
Уровни экспрессии мрнк белков BASP1 и MARCKS в почках крыс линии SHR 76
- Д.Д. Андреева, В.В. Сиренко, О.Е. Карпичева, Ю.С. Боровиков*
Влияние бдм на взаимодействие миозина с актином в атфазном цикле 76
- Н.А. Басалова, Е.С. Новоселецкая, О.А. Григорьева, П.П. Нимирицкий, П.И. Макаревич, А.Ю. Ефименко*
Децеллюляризованный внеклеточный матрикс, продуцированный стромальными клетками, как модель профибротического микроокружения in vitro 77
- Э.В. Бенагуев, И.А. Владимиров, О.А. Павлова, Д.И. Богомаз*
Точный и экономически эффективный метод генотипирования однонуклеотидного полиморфизма с помощью пцр-рв 78
- А.В. Бернадо, К.И. Давлетова, А.А. Студеникина*
Влияние фактора дифференцировки hldf на продукцию белков и цитокинов при заболеваниях молочной железы 78
- А.А. Богданова*
Опухоль-ассоциированные макрофаги при впч-позитивных опухолях головы и шеи 79
- А.В. Бузенкова, Р.Х. Мухамеджанов, Л.А. Таширева*
Мезенхимальные стволовые клетки ассоциированы с развитием лимфогенных метастазов у больных раком молочной железы . 79
- В.Ю. Васильева, А.В. Сударикова, Е.А. Морачевская, Ю.А. Негуляев, В.И. Чубинский-Надеждин*
Сравнительный анализ действия селективных активаторов каналов *piezo1* на мембранные токи в клетках к562 80
- Г.В. Васильева, Д.Г. Тентлер*
Создание тест-системы для определения ингибиторов TG2 80
- О.В. Ветровой, П.П. Нимирицкий, Е.В. Ломерт*
Роль hif1-зависимой супрессии пентозофосфатного в патогенезе постгипоксической реоксигенации мозга 81
- М.А. Виговский, О.А. Григорьева, Н.А. Александрюшкина, Н.А. Басалова, М.А. Кулебякина, А.Ю. Ефименко*
Роль окислительного стресса в трансдифференцировке клеток при патогенезе фиброза 81
- С.А. Владимирова, А.Д. Никотина, Д.А. Алексеев, Б.А. Маргулис, И.В. Гужова.*
Hsp70 способствует эпителиально-мезенхимальному переходу в клетках колоректального рака dld1 82
- А.Д. Воронова, О.В. Степанова, Т.Г. Куликова, М.П. Валихов, Т.В. Кузнецова, Р.А. Полтавцева, Г.Т. Сухих, В.П. Масенко*
Изучение уровней экспрессии *pragα* в развивающемся сердце человека и миокарде пациентов с сердечной недостаточностью 83
- С.М. Вострикова, А.Б. Гринев*
Влияние водорастворимого аналога витамина е на гибель опухолевых клеток, индуцированную днк-повреждающими химиотерапевтическими препаратами 83

<i>Д.В. Гаврилов, О.В. Галибин, Э. Питкин, Н.М. Юдинцева, М.И. Блинова, М.Р. Питкин, М.А. Шевцов</i> Использование пористых титановых имплантатов с серебряным покрытием для эндо-экзо протезирования конечностей	84	<i>М.В. Зорин, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис, В.Ф. Лазарев</i> Роль белка глицеральдегид-3- фосфатдегидрогеназы в развитии вторичных повреждений после черепно-мозговой травмы ..	90
<i>А.О. Гайдамака, М.Ю. Кордюкова, А.И. Калмыкова</i> ВЛИЯНИЕ ТЕЛОМЕРНОЙ ДИСФУНКЦИИ НА БИОГЕНЕЗ ЦЕНТРОСОМ В ЯИЧНИКАХ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	84	<i>Л.Ш. Измайлова, А.В. Косых, Е.А. Воротеляк, А.В. Васильев</i> Моделирование имплантации эмбрионов мыши	91
<i>А.В. Глинских, А.Е. Акулов</i> Метаболомный анализ влияния сахарного диабета 1-го типа на мозг мышей линии <i>pod scid</i>	85	<i>А.С. Ильницкая, И.Ю. Житняк, А. Готро, Н.А. Глушанкова</i> Иммунофлуоресцентное исследование внутриклеточного распределения <i>sash1</i> в нормальных и трансформированных эпителиальных клетках	91
<i>Ю.А. Гненная, М. Piacentini, Н.А. Барлев</i> Изучение взаимодействия трансклутаминазы 2 с транскрипционным фактором <i>p73</i> в контексте опухолеобразования	86	<i>Р.А. Кадырова, Н.А. Барлев, Д.Г. Тентлер, В.З. Кривицкая, А.В. Слита, В.В. Зарубаев</i> Изменение уровня экспрессии белков вируса гриппа <i>a</i> в условиях ингибирования <i>set7/9 in vitro</i>	92
<i>А.Д. Григорьев, А.Ю. Скопин, Л.Н. Глушанкова, Е.В. Казначеева</i> Поиск ингибиторов входа кальция, опосредованного белками <i>stim2</i> и <i>ora13</i>	86	<i>Я.К. Капуцак, Р.А. Тумашев</i> Механизмы развития почечной недостаточности у хомячков <i>m. Auratus</i> в динамике хронического экспериментального описторхоза	92
<i>К.В. Данько, С.В. Орлов</i> Эндогенный аполипопротеин <i>a1</i> как модулятор секреции цитокинов макрофагами <i>m1</i> и <i>m2</i> , дифференцированными из моноцитов периферической крови человека	87	<i>А.И. Качалова, Д.М. Поташникова, А.А. Саидова, И.А. Воробьев</i> Иммунофенотипические и функциональные особенности модельных клеточных линий рака простаты <i>pc3</i> и <i>22rv1</i>	93
<i>М.А. Добрынин, Н.М. Корчагина, А.Д. Гржибельский, Д. Шафранская, Н.И. Енукашвили</i> Транскрипты тандемно повторяющейся <i>dnk</i> участвуют в формировании безмембранных, ассоциированных с митохондриями структур в преовуляторных ооцитах человека	87	<i>А.В. Ковалева, Е.С. Соломатина, А.В. Творогова, А.А. Саидова, И.А. Воробьев</i> Морфология фокальных контактов при ингибировании киназ <i>gosc</i> и <i>mlck</i>	94
<i>Х.Х. Епремян, Р.А. Зиновкин</i> Дрожжевая модель гепатоцеллюлярной карциномы	88	<i>И.В. Ковалева, Л.В. Спирина</i> Экспрессия рецепторов прогестерона, эстрогенов и андрогенов при раке и доброкачественной гиперплазии предстательной железы, связь с ростовыми и транскрипционными факторами	94
<i>А.В. Ерофеева, А.Д. Никотина, Б.А. Маргулис, И.В. Гужова</i> Карденолид <i>cl-43</i> опосредует протеасомную деградацию <i>hsf1</i> в клетках колоректального рака	88	<i>А.А. Коваленко, М.В. Захарова, А.П. Шварц, О.Е. Зубарева, А.В. Зайцев</i> Анализ изменений экспрессии генов глутаматных метаболитных рецепторов в мозге крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии и модели фебрильных судорог	95
<i>Е.А. Жайворон, К.С. Новицкая, Е.В. Ломерт, Д.Г. Тентлер</i> Использование наноантител для функционального подавления <i>astn4</i>	89	<i>Д.О. Колесников, А.Ю. Скопин, Л.Н. Глушанкова, С.В. Созонова, Е.В. Казначеева, А.В. Шалыгин.</i> Роль белков <i>ora1</i> и <i>stim</i> в регуляции эндогенных депо-управляемых кальциевых каналов <i>trpc1</i> в клетках НЕК293	95
<i>О.Г. Запарина, А.В. Ковнер</i> Антиоксиданты разного механизма действия снижают неоплазию эпителия желчных протоков при экспериментальном описторхозе .	90	<i>В.В. Косенчук., С.И. Якушев, И.В. Уласов</i> Вирусная <i>stn70-3r</i> микрорнк ингибирует аутофагию в клетках глиобластомы	96

<i>А.С. Костина, А.М. Киселёв, Д.С. Семёнова, О.Б. Иртюга, А.А. Костарева, А.Б. Малашичева</i> Notch-зависимая регуляция остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток аортального клапана	96	<i>А.С. Миценых, Е.В. Абакушина</i> Оценка жизнеспособности эмбрионов после витрификации	103
<i>Г.Ю. Кочмарева, К.С. Семашенко, А.А. Косинова, Т.Н. Субботина, А.А. Савченко, Ю.И. Гринштейн</i> Генетические маркеры, ассоциированные с проявлением резистентности к ацетилсалициловой кислоте у пациентов с ИБС	97	<i>А.С. Могиленских, Е.О. Шамшурина</i> Морфологическая оценка клеток карциномы молочной железы тройного негативного подтипа в первичной культуре	104
<i>Д.В. Курочкин, И.Е. Маслюкова, Т.Н. Субботина</i> Метод hgm как метод скрининга соматических мутаций у пациентов с хмн	97	<i>Е.И. Моргун, О.С. Роговая, К.К. Сухинич, Е.А. Воротеляк</i> Образование рубца под воздействием тканеинженерной конструкции в модели длительно незаживающей раны	104
<i>Н.И. Литовка, С.Н. Рубцова, И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова</i> Реорганизация актинового цитоскелета и межклеточных адгезионных контактов на ранних этапах эпителиально-мезенхимального перехода	98	<i>А.А. Мурылёва, С.Л. Воробьёв, Е.О. Синегубова, А.В. Слита</i> Получение и характеристика культуры клеток аденокарциномы желудка человека	105
<i>Е.С. Лылова, Е.М. Жидкова, Е.М. Кулакова, О.А. Власова, А.В. Савинкова</i> Оценка уровня генотоксических повреждений у работников химиотерапевтических отделений .	99	<i>О.В. Надей, Н.И. Агалакова</i> Гиперстимуляция сигнального каскада кальпаина-1 как одна из причин снижения когнитивных способностей у крыс с экспериментальным флюорозом	105
<i>А.С. Лысенко, Е.С. Селиверстов, Е.В. Зубарева</i> Влияние нового класса ингибиторов gsk-3β на клетки аденокарциномы человека	99	<i>А.В. Ноздрачева, Н.М. Плескач, М.Л. Куранова</i> Исследование клеточного цикла, ядерной ламины и фермента β-галактозидазы в дермальных фибробластах человека при развитии рака и ускоренном старении	106
<i>А.В. Майтова, А.В. Гризель, А.Е. Зобнина, Н.А. Горшенева, А.А. Рубель, Ю.О. Чернов</i> Консервация и дивергенция прионных свойств белка sup35 из разных видов дрожжей	100	<i>Н.А. Обанина, С.Р. Ноговицина, Ю.С. Таскаева, Н.П. Бгатова</i> Аутофагия в цитоплазме фоторецепторных клеток сетчатки глаза человека при глаукоме .	106
<i>С.А. Макеёнок, Л.С. Шуйский, А.В. Шалыгин, Е.В. Казначеева, К.О. Гусев</i> Изменение депо-управляемого входа кальция при диабетической нефропатии	100	<i>Е.А. Орлова, А.В. Жолудева, М.Е. Ломакина, А. Полесская, А. Готро, А.Ю. Александрова</i> Влияние экспрессии белка anks1a на подвижность нормальных и опухолевых клеток	107
<i>М.А. Малинчик, О.С. Коноплева, Горбачева Н.Н., М.В. Смольникова</i> Полиморфизм <i>il13</i> rs1800925 при детской бронхиальной астме	101	<i>М.Н. Парыгина</i> Белок <i>cdx2</i> как ведущий маркер атрофии слизистой оболочки желудка	108
<i>Т.А. Марусова, А.В. Моршнева, О.О. Гнедина, М.В. Иготти</i> Влияние ротенона на пролиферацию раковых и трансформированных клеток	101	<i>Д.В. Пономарев, Е.С. Савина, О.Г. Запарина</i> Внеклеточные везикулы возбудителя описторхоза трематоды <i>opisthorchis felineus</i> увеличивают скорость миграции и пролиферации холангиоцитов человека h69	108
<i>И.В. Межевова, В.И. Вошедский, Е.А. Дженкова, Е.С. Бондаренко, М.А. Командиров, А.О. Ситковская</i> Влияние лучевой терапии на культуру клеток рака легкого h1299	102	<i>А.Д. Поспелов, Е.И. Черкасова, Л.Б. Тимофеева, И.В. Балалаева</i> Получение бесклеточных органных матриксов и их репопуляция опухолевыми клетками	109
<i>Е.П. Минина, А.К. Величко, О.Л. Кантидзе</i> Исследование влияния поли(рг)-пептида на компартиментализацию клеточного ядра	103	<i>Д.М. Поташникова, М.А. Тихомирова, А.А. Саидова</i> Роль тат-белка в защите от апоптоза в культуре в-лимфоцитов grm18866	109

<i>Н.Г. Преснухина, В.И. Першин, Н.С. Максимова, О.М. Широкова, О.Г. Заборская, Т.Ф. Ковалева, И.А. Медяник, И.В. Мухина</i> Сравнение методов выделения экзосом из первичных культур глиомы человека	110	<i>А. Сулеймен, Б.Б. Рахимова, А.С. Ерубай, С.А. Джангильдинова, Г. Сулеймен, А.М. Айткулов, М.А. Кинаятов, Б.Ж. Култанов</i> Изменение структуры семенников экспериментальных животных при воздействии пыле-солевых аэрозолей аральского моря	116
<i>П.В. Пчелин, М.А. Коротыш, Т.Ф. Ковалёва, С.В. Копишинская, И.В. Мухина</i> Митохондриальное дыхание скелетных мышц у пациентов с болезнью гентингтона изменяется до манифестации заболевания ...	110	<i>И.Б. Сухов, О.В. Чистякова, К.В. Деркач, А.О. Шпаков</i> Влияние интраназального введения инсулина на инсулин-зависимые сигнальные системы в кардиомиоцитах крыс при экспериментальном сахарном диабете 1-го типа	116
<i>А.А. Романова, А. Сагайдак, Т.А. Григорьева, Е.А. Чернявская, М.Ю. Львова, В.Г. Трибулович</i> Оптимизация протокола получения суммарной рнк клеточной линии hct116 для проведения от-пцр в реальном времени	111	<i>Р.Б. Тагаева, Л.Ю. Яковлева, Б.П. Николаев, Я.Ю. Марченко, Н.М. Юдинцева, М.А. Шевцов</i> Применение конъюгата суперпарамагнитных наночастиц с гранзимом в (grb-sprions) в тераностике опухолей головного мозга	117
<i>Д.Д. Ромашин, М.Н. Карагяур, Н.Г. Лузгина, А.Л. Русанов.</i> Получение клеточной модели на основе нормальных кератиноцитов человека линии hscat с нокдауном гена <i>tp53</i>	111	<i>Е.К. Тананыкина, О.А. Фёдорова, Н.А. Барлев, О.Ю. Шувалов</i> Сплайс-изоформы <i>mdm2</i> в клеточных моделях рака лёгкого и молочной железы человека	118
<i>Т.С. Салль, Е.С. Щербакова, Е.В. Демьянова, Т.Я. Вахитов</i> Изучение биологической активности метаболитов кишечной микробиоты на клеточных моделях заболеваний ЖКТ	112	<i>Л.А. Таширева, Л.С. Ляпунова, К.О. Завгородская, А.В. Бузенкова</i> Частота встречаемости хелперных лимфоцитов 1 и 2 типа врожденной иммунной системы в ткани инвазивной карциномы	118
<i>О.О. Сербина, Е.В. Киселева, Е.С. Васецкий</i> Роль клеточных взаимодействий в развитии фиброза при лппмд	112	<i>С.В. Тимофеева, А.О. Ситковская, Э.Е. Росторгуев, Н.С. Кузнецова, С.Ю. Филиппова, И.В. Межевова, Т.В. Шамова</i> Первичные клеточные линии как источник биоматериала для создания <i>in vivo</i> подобной модели глиомы	119
<i>А.Ю. Сидоров, Т.В. Храмова, Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, А.С. Терентьев, Л.У. Гильманова, А.Н. Горбушина</i> Структура и физико-химические свойства иммуносупрессивных fc фрагментов <i>igg</i>	113	<i>Е.П. Турищева, М.С. Вильданова, А.А. Саидова, Е.А. Смирнова</i> Растительные гормоны вызывают появление признаков стресса эндоплазматического ретикулума в дермальных фибробластах человека	119
<i>М.Ю. Сироткина, Д.М. Дарвиш, Ю.А. Нащекина</i> Культивирование клеток роговицы на модифицированных коллагеновых пленках .	113	<i>А.А. Фалеева, Т.Н. Субботина, Е.А. Дунаева, К.О. Миронов, М.А. Михалёв, Е.В. Васильев, А.А. Савченко</i> Алгоритм генетического обследования пациентов с эритроцитозом	120
<i>Е.М. Согорина, Д.А. Мордовкина, И.С. Ильин, В.Б. Сулимов, Н.И. Моисеева, Л.П. Овчинников</i> Влияние галогенпроизводных триазолохиназололин-8-онов на локализацию белка <i>ub-1</i>	114	<i>И.А. Филонова, В.В. Лемещенко</i> Структурная незавершенность компонентов миокарда у новорожденных ягнят	120
<i>Е.С. Соломатина, А.В. Ковалева, А.В. Творогова, А.А. Саидова, И.А. Воробьев</i> Влияние миозина <i>ii</i> на параметры фокальных контактов и миграторный потенциал клеток линии <i>a549</i>	115	<i>А.А. Фирсенкова, А.А. Пиневиц, О.А. Шашкова, И.С. Малахов, М.А. Берлина, Л.А. Терехина, М.П. Самойлович</i> Визуализация сосудистой сети солидных опухолей у крыс с помощью моноклональных антител против эндоглина	121
<i>А.Ю. Столбовая, И.В. Смирнов, Н.Л. Вартамян, А.Б. Малашичева, М.П. Самойлович</i> Экспрессия генов <i>micA</i> и <i>micB</i> в культивируемых клеточных линиях	115		

<i>З.М. Хайруллина, В.Ю. Васильева, А.В. Сударикова, Ю.А. Негуляев, В.И. Чубинский-Надеждин</i> Функциональный анализ активности кальций-зависимых калиевых каналов в клетках миелоидной лейкемии человека к562	122	<i>Д.Д. Бондарук, Е.В. Голубкова, Л.А. Мамон, С.Ф. Кливер, В.Р. Гинанова</i> Особенности специфического интрона в составе последовательностей генов <i>lhx1</i> у представителей различных таксономических групп	128
<i>Е.Н. Чернец, С.Н. Бардаков, Р.М. Магомедова, З.Р. Умаханова, К.З. Зульфугаров, П.Г. Ахмедова, В.А. Царгуш, А.А. Титова, М.О. Мавликеев, В.Л. Зорин, Г.Д. Далгатова, А.А. Исаев, Р.В. Деев</i> Внутрисемейный фенотипический полиморфизм коллаген vi-ассоциированных миопатий	122	<i>Н.А. Буланцев, А.С. Комиссаров, Е.И. Кошель, Е.Е. Круглов, Ю.В. Мякишева, Л.А. Кафтырева</i> Метагеномный анализ биоптатов толстой кишки пациентов с язвенным колитом	129
<i>О.Н. Чернова, М.О. Мавликеев, И.С. Лимаев, М.В. Елистратова, А.П. Киясов, Р.В. Деев</i> Морфологические особенности физиологического и репаративного миоглиогенеза при мутации в гене <i>dysf</i>	123	<i>Н.В. Булатенко, А.С. Ефремова, Т.Б. Бухарова, Н.В. Петрова, Н.Ю. Каширская, Ю.Л. Мельяновская, Е.И. Кондратьева, Д.В. Гольдштейн</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТАТОЧНОЙ ФУНКЦИИ ХЛОРНОГО КАНАЛА CFTR У ПАЦИЕНТА С ГЕНОТИПОМ CFTR dele2,3 /E403D НА МОДЕЛИ КИШЕЧНЫХ ОРГАНОИДОВ	129
<i>М.В. Черноруцкий, А.В. Панова, О.В. Волкова, М.Н. Калинин</i> Оценка вклада системных и клеточных механизмов в формирование тканевой адаптации к липидной нагрузке	123	<i>В.Ю. Буслаев, В.И. Минина, О.А. Соболева, В.Г. Дружинин</i> Микробиом мокроты и полиморфизм гена <i>tp53</i> у больных раком лёгкого	130
<i>А.В. Чубарь, Н.Ю. Семенова, Н.И. Енукашвили</i> Транскрипция тандемно повторяющейся днк в мезенхимных стромальных клетках повреждённой гематологической ниши	124	<i>М.Е. Владимирова, В.С. Мунтян, М.Л. Румянцева</i> Геномные острова <i>sinorhizobium meliloti</i> , встроенные в трнк- <i>thr(ggt)</i>	131
<i>В.С. Шадрин, П.М. Кожин, А.Л. Русанов, Н.Г. Лузгина</i> Разработка подходов к моделированию патологических гиперпластических процессов в области послеоперационного рубца	125	<i>Е.А. Ганцова, О.В. Серова, И.Е. Деев, А.Г. Петренко</i> Гены рh-чувствительности, активируемые в почках нокаутных по гену <i>insrg</i> мышей при щелочной нагрузке	132
<i>К.Ю. Шардина, С.А. Заморина, В.П. Тимганова, М.С. Бочкова</i> Влияние наночастиц оксида графена на дифференцировку миелоидных супрессорных клеток (<i>mdsc</i>)	125	<i>А.Г. Гринько, Е.И. Степченкова, Ю.И. Павлов</i> Поиск факторов, регулирующих активность <i>tlc</i> днк-полимеразы <i>polζ</i> на неповрежденной матрице днк	132
<i>О.Ю. Шувалов, А.И. Кизенко, О.А. Федорова, А.А. Дакс, Н.А. Барлев</i> Биологические функции семеногелинов 1 и 2 в клеточных моделях опухолей человека .	126	<i>М.А. Даугавет, М.В. Грецова, О.И. Подгорная</i> Цистеин-богатые повторы могут служить инструментом для поиска генов, перенесённых от прокариот в геномы грибов и многоклеточных животных	133
<i>Е.А. Щетникова, Е.Д. Вдовина, Г.С. Зыкова</i> Повышенный уровень хромосомных aberrаций у работников алюминиевого производства и у жителей прилегающих к заводу территорий	126	<i>В.А. Дикая, А.О. Травина, Д.И. Остромышенский, О.И. Подгорная, А.С. Комиссаров</i> Анализ состава транскриптома травяной лягушки <i>rana temporaria</i>	133
		<i>А.С. Жук, А.Э. Романович, Е.И. Степченкова, С.Г. Инге-Вечтомов</i> Метод выявления нарушений генетического материала у дрожжей <i>saccharomyces cerevisiae</i> с использованием репортерной системы <i>ptfa1-gfp</i> и проточной цитометрии ..	134
		<i>А.А. Жукова, В.А. Володькина, А.Г. Демин, М.М. Кулак, О.А. Павлова, С.А. Галкина, А.Ф. Сайфитдинова</i> Кластер генов <i>rrnk</i> у японского перепела (<i>coturnix japonica</i>)	135

13 ОКТЯБРЯ 2020

ГЕНЕТИКА И БИОНФОРМАТИКА

<i>Е.В. Большакова, А.Ф. Сайфитдинова</i> Поиск генов-кандидатов на роль мишеней регуляции половой дифференцировки у курицы	128
--	-----

<i>А.К. Какойченкова, И.В. Жильцов, К.Л. Дедюля, Ю.Н. Орловский, А. Бауэр, Й. Хохаизель, П.В. Назаров</i>	<i>В.В. Лашкул, А.Е. Зобнина, А.Ю. Аксенова, Д.В. Качкин, А.А. Зелинский, О.А. Маликова, А.А. Рубель, Ю.О. Чернов</i>
Использование деконволюции транскриптомных данных для оценки клинически значимых сигналов у пациентов со злокачественными новообразованиями поджелудочной железы 135	Оценка способности рибосомальных белков к агрегации 141
<i>В.С. Камарян, А.Т. Макичян, Е.А. Попугаева, Д.П. Чернюк, Л.С. Унанян</i>	<i>В.А. Ли, Д.И. Жигалина</i>
Докинг и конформационный анализ производного пиперазина потенциального терапевтического препарата для лечения болезни Альцгеймера 136	Молекулярно-цитогенетический анализ цитотрофобласта спонтанных абортусов с низкой пролиферативной активностью клеток <i>in vitro</i> 142
<i>О.Л. Кантидзе</i>	<i>С.П. Медведев</i>
Методы геномики и микроскопии сверхвысокого разрешения как инструменты для исследования 3d-генома 136	Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки, редактирование геномов и генетически кодируемые биосенсоры: синтез технологий для решения биомедицинских задач 142
<i>М.Н. Карагяур, М.Г. Гладкова, М.Н. Скрыбина, С.С. Джауари, Е.В. Семина, А.Ю. Ефименко, К.Ю. Кулебякин, П.А. Тюрин-Кузьмин, В.А. Ткачук</i>	<i>Е.С. Минина, А.К. Какойченкова, И.С. Минин</i>
Медицинская геномика: современное состояние и тенденции развития 137	Функциональный анализ транскриптомов клеток назального лаважа у пациентов с бронхиальной астмой на фоне вирусной инфекции 143
<i>Д.В. Качкин, А.А. Зелинский, Ю.И. Хорольская, К.Ю. Куличихин, А.А. Рубель, Ю.О. Чернов</i>	<i>А.А. Мурашкина, Р.Р. Савченко, С.А. Васильев</i>
Изучение агрегации белка pnc3 в клетках микроорганизмов и человека 137	Изменение транскрипционного профиля в линиях, нокаутных по генам <i>ADAMTS1</i> и <i>THBS1</i> 143
<i>Е.С. Клушевская, Н.А. Чуриков</i>	<i>А.Д. Мутин, К.П. Верещагина, Л. Якоб, Д.С. Бедулина, М. Люкассен, М.А. Тимофеев</i>
Анализ межхромосомных контактов ядрышек с генами <i>dix4</i> человека с помощью fish 138	Экспрессия генов энергетического метаболизма байкальских эндемичных и голарктических амфипод в условиях постепенного повышения температуры 144
<i>В.В. Козин, А.Ю. Шалаева, А.И. Кайров, И.Е. Борисенко, К.В. Халтурин, Р.П. Костюченко</i>	<i>М.А. Орлов, Т.Р. Джелядин, А.А. Сорокин</i>
Геномный, транскриптомный и функциональный анализ канонического wnt-сигналинга у нееридных полихет 139	Промотор т7 бактериофага: связь специфичности и последовательности опосредована физикой дуплекса днк? 144
<i>А.П. Козлова, В.С. Мунтян, Е.А. Дзюбенко, А.М. Афонин, М.Л. Румянцева</i>	<i>А.И. Пасынков, Е.В. Голубкова, Л.А. Мамон, А.О. Якимова</i>
Новая рекомбинантная форма ризофага 16-3 из почв Кавказа 139	Сохранение интронов в ходе альтернативного сплайсинга как механизм увеличения разнообразия продуктов матричных процессов на примере гена <i>pxf1</i> 145
<i>И.П. Копнин, Н.А. Логвина, И.О. Апарин, Т.С. Зацепин</i>	<i>А.Л. Подлевских, И.Е. Борисенко</i>
Новые химические модификации рнк для улучшения редактирования генома с использованием системы <i>crispr-cas9</i> 140	Организация сигнального пути <i>tgf-beta</i> и его активность в развитии губки <i>halisarca dujardini</i> 146
<i>Я.А. Кучинская, Е.С. Боровых, М.А. Некрасова, А.Ю. Конев</i>	<i>М.С. Попик, А.И. Соловьева, О.И. Подгорная</i>
Изучение локализации факторов сборки и ремоделирования хроматина в подвергающейся дозовой компенсации x-хромосоме у самцов дрозофилы 140	Клонирование и анализ нуклеотидной последовательности ретротранспозона <i>rho</i> из генома трематоды <i>himasthla elongata</i> 146
	<i>Я.А. Портная, Ю.П. Джиоев, Л.А. Степаненко, А.Ю. Борисенко, О.Г. Карноухова, В.И. Злобин</i>
	Биоинформационный анализ структуры <i>crispr / cas</i> -системы <i>pseudomonas aeruginosa</i> <i>ncct10728</i> 147

<i>С.С. Ряховский, А.С. Комиссаров</i> Поиск и визуализация таар генов в собранных геномах позвоночных	147	<i>А.В. Цуканов, В.Г. Левицкий</i> Поиск скрытых сайтов связывания транскрипционных факторов в данных chip-seq	154
<i>А.С. Саксаганская, В.С. Мунтян, Б.В. Симаров, М.Л. Румянцева</i> Криптические плазмиды <i>sinorhizobium meliloti</i> — природные рекомбинантные репликоны	148	<i>П.Д. Чеснокова, Е.А. Ковтунов, Н.С. Величко, А.С. Комиссаров</i> Особенности структурной организации оперонов о-антигена в геноме <i>herbaspirillum frisingense</i>	154
<i>А.Е. Саранчина, П.Б. Дроздова, М.М. Моргунова, Б.К. Бадуев, М.А. Тимофеев</i> Факторы, влияющие на окраску эндемичного вида амфипод озера байкал <i>eulimnogammarus suapeus</i>	149	<i>М.А. Шилина, Л.Л. Алексеенко, И.В. Кожухарова, О.Г. Люблинская, Т.М. Гринчук</i> Нестабильность генома фибробластов китайского хомячка в культуре, вызванная кратковременной обработкой полиаллиламином сохраняется у потомков	155
<i>Е.С. Сердюкова, О.Ю. Васильева, А.В. Марков, С.А. Васильев</i> Метилирование промоторов генов в цитотрофобласте у спонтанных абортусов: взаимосвязь с анеуплоидией	149	<i>А.С. Штомпель, А.В. Маслова, А.В. Красикова</i> Визуализация и анализ 3d-расстояний локусов из топологически-ассоциированных доменов в соматических клетках курицы	155
<i>С.С. Скрипкин, М.Д. Бочкарева, И.Р. Иматдинов</i> Рациональный дизайн модифицированных гликопротеинов вируса марбург	150	<i>В.Д. Щербинина</i> Дестабилизация генома половых клеток самцов мышей при ольфакторном стрессе	156
<i>Е.И. Сысов, А.А. Шенфельд, Ю.В. Сопова, А.П. Галкин</i> Анализ амилоидных свойств фрагментов белка tbr в бактериальной системе c-dag	150	<i>С.И. Якушов, В.В. Косенчук, И.В. Уласов</i> Взаимодействие белков <i>beslin-1</i> и <i>beslin-2</i> в клетках глиобластомы при прогрессии опухоли и при ответе на терапию ..	156
<i>С.А. Тимофеев, Г.В. Митина, Е.А. Рогожин, В.В. Долгих</i> Экспрессия токсина паука <i>agelena orientalis</i> в энтомопатогенном грибе <i>lecanicillium muscarium</i> и отбор штамма, характеризующегося эффективной секрецией рекомбинантного белка	151	14 ОКТЯБРЯ 2020 НЕЙРОБИОЛОГИЯ	
<i>М.И. Тылец, О.И. Подгорная, Т.Г. Шапошникова, А.И. Соловьева, С.В. Шабельников, А.Г. Миттенберг, М.А. Даугавет</i> Новый белок, участвующий в формировании внеклеточного матрикса туники асцидий отряда <i>stolidobranchia</i>	151	<i>Р.Р. Гайнетдинов</i> Трансгенные модели в трансляционной биомедицине	158
<i>Д.А. Федоров</i> Борьба с ложноотрицательными результатами при поиске генотипов, ассоциированных с долголетием (на примере <i>nos3-intron-4-vntr</i>)	152	<i>Э.Д. Гатаулина, В.И. Шахматова, С.А. Дмитриева, Г.Ф. Ситдикова, А.В. Яковлев</i> Исследование развития оксидативного стресса в тканях головного мозга у крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией	158
<i>А.С. Федосова, Н.Н. Шпилова</i> Фармакогенетические особенности ответа пациентов на дофаминергическую терапию при болезни паркинсона	153	<i>Д.Н. Голубева, А.В. Чижов, С.Л. Малкин</i> Математическое моделирование влияния транспортеров глутамата <i>eaat2</i> на постсинаптические сигналы в гиппокампальных срезах	159
<i>А.А. Хмелевская, Н.А. Быкова, Г.А. Ефимов</i> Т-клеточный ответ на иммунодоминантные минорные антигены гистосовместимости после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток	153	<i>О.В. Градов</i> Модели диаграмм направленности в реконструкциях аксонального наведения во внешнем электрическом поле	159
		<i>Д.А. Грехнёв, В.А. Вигонт, Е.В. Казначеева</i> Полиглутаминовые нейродегенеративные заболевания: нарушение кальциевой сигнализации и селективная гибель нейронов .	160

<i>В.В. Гусельникова</i> Сравнительный анализ методов гистологического выявления амилоидных бляшек у человека 160	<i>К.С. Королёва, Е.В. Ермакова, Г.Ф. Ситдикова</i> Влияние донора сероводорода на уровень дегрануляции менингеальных тучных клеток крыс 167
<i>С.А. Денисова, С.В. Щенков</i> Цитоморфология нервной системы церкарий трематод на примере <i>sercaria parvicaudata</i> (digenea, renicolidae) 161	<i>Е.Д. Курмашова, Э.Д. Гатаулина</i> Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на возрастное изменение нмда-рецепторов крыс 168
<i>П.А. Егорова, И.Б. Безпрозванный</i> Стабилизация кальциевого статуса клеток пуркинью способствует регенерации мозжечка мышей-моделей атаксии 162	<i>В.Ф. Лазарев, Е.А. Дутышева, Е.Р. Михайлова, И.В. Гужова, Б.А. Маргулис</i> Молекулярные мишени для комбинированной терапии нейродегенеративных заболеваний .. 168
<i>А.С. Жигулин, М.Ю. Дронь, О.И. Барыгин</i> Механизмы ингибирования аттра рецепторов диамидиновыми соединениями 162	<i>А.В. Литвинова, А.А. Бутина, Е.Н. Верзилина, Д.В. Трофименкова, Ю.А. Власова</i> Эффект парацетамола на клетки рс12 при токсическом воздействии бактериального липополисахарида 169
<i>Г.Ф. Закирьянова, А.М. Петров</i> Механизм действия 25-гидроксихолестерина в модуляции нервно-мышечной передачи 163	<i>М.М. Логинова, Р.С. Ярков, Т.А. Мищенко, М.В. Ведунова, Е.В. Митрошина</i> Роль киназ ikkb, src и grk в адаптации нервных клеток к воздействию гипоксии и глюкозной депривации in vitro 169
<i>М.В. Захарова, А.А. Коваленко, А.П. Шварц, О.Е. Зубарева, А.В. Зайцев</i> Изменение экспрессии генов астроцитарных белков в экспериментальной модели височной эпилепсии 163	<i>Д.С. Матюшкина, И.О. Бутенко, Г.Ю. Фисунов, Д.В. Евсютина, В.М. Говорун</i> Роль микоплазменной инфекции в развитии нейродегенеративных заболеваний 170
<i>А.А. Измайлов, М.Е. Соколов, В.А. Маркосян, Р.Р. Гарифулин, Ф.О. Фадеев, М.А. Давлеева, М.С. Кузнецов, А.Н. Лисюков, Э.З. Сафиуллов</i> Клеточно-опосредованная генная терапия с помощью генетически модифицированного лейкоконцентрата для стимулирования нейрорегенерации 164	<i>А.В. Михель, А.Д. Щербицкая</i> Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на формирование нервной ткани крыс 170
<i>А.Р. Ильина, Н.А. Красковская, Н.С. Линькова</i> Анализ патоморфологических изменений дендритных шипиков нейронов са ¹ области гиппокампа в мышинной модели болезни альцгеймера 5xfad-m 165	<i>А.Н. Нагуманова, А.Э. Вылегжанина, И.Г. Шалагинова, Д.А.-А. Хлебаева</i> Постстрессорное изменение лейкоцитарного состава крови у крыс с различным уровнем возбудимости нервной системы 171
<i>Е.К. Карсунцева, А.Д. Воронова, О.В. Степанова, М.П. Валихов, А.В. Чадин, А.С. Семкина, Г.А. Фурса, П.А. Мельников, И.В. Решетов, В.П. Чехонин</i> Выживаемость трансплантированных клеток обонятельной выстилки человека при посттравматических кистах спинного мозга ... 165	<i>В.А. Никитина, Д.В. Крицкая, А.П. Шварц, Е.А. Вениаминова, В.С. Шавва, С.А. Апрятин, М.Н. Карпенко, К.П. Щербакова, А.Н. Трофимов</i> Улучшение показателей памяти крыс при введении среднепочечных триглицеридов сопровождается усилением экспрессии генов nmda- и аттра-рецепторов в коре мозга 171
<i>Е.А. Козубенко, Н.А. Сидорова, П.А. Зыкин, Л.А. Ткаченко</i> Иммуногистохимическое распределение слой-специфичных маркеров в коре головного мозга человека во второй половине гестации . 166	<i>Е.А. Олейник, А.А. Наумова, М.В. Глазова</i> Роль взаимодействия протеинкиназы с-abl и белка р53 в регуляции активации erk1/2 каскада 172
<i>Е.А. Колос</i> Реактивные изменения клеток-сателлитов спинномозгового ганглия крысы 167	<i>М.Б. Пази, Д.В. Белан, Е.Ю. Комарова, И.В. Екимова</i> Механизм реализации защитного действия глюкозо-регулируемого белка теплового шока grp78 173

<i>Е.И. Пчицкая, И.С. Крылов, И.Б. Безпрозванный</i> Определение численных значений морфологических параметров дендритных шипиков на конфокальных изображениях нейронов	173	<i>А.А. Чесноков, Р.В. Галлямутдинов</i> Анализ ядерно-цитоплазматического отношения в клетках пуркиньи при экспериментальном сахарном диабете 1 типа .	180
<i>В.А. Разенкова, Д.Э. Коржевский</i> Морфологические особенности гамк-ергической системы головного мозга крысы в конце первой недели постнатального развития	174	<i>А.В. Чурилова, Т.Г. Зачепило</i> Оценка активации аутофагии в мозге крыс после действия гипобарической гипоксии	181
<i>А.В. Раковская, Е.И. Пчицкая, И.Б. Безпрозванный</i> Гиперэкспрессия белка eб3 вызывает увеличение размера кластеров белка psd95 в гиппокампальных нейронах	175	<i>И.Ф. Шайдуллов, А.Ш. Гайфуллина, Е.В. Ермакова, Г.Ф. Ситдикова</i> Роль метаболита этанола — уксусной кислоты в активации <i>hK</i> -каналов <i>gh3</i> клеток гипофиза крысы	182
<i>П.И. Семенюк, А. Софронова</i> Влияние гликирования на взаимодействие глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы с партнерами, вовлеченными в развитие нейродегенерации	176	<i>И.Г. Шалагинова, О.П. Тучина, М.В. Сидорова, А.И. Вайдо, Н.А. Дюжикова</i> Выраженность постстрессорного нейровоспаления у крыс с различным уровнем возбудимости нервной системы	182
<i>И.А. Таржанов, А.Е. Згодова, Н.В. Лизунова, З.В. Бакаева, Н.М. Грецкая, В.В. Безуглов, А.М. Сурин, В.Г. Пинелис</i> Влияние <i>n</i> -докозагексаеноилдофамина на выживаемость и внутриклеточный кальций в культивируемых нейронах при глутаматной эксайтотоксичности	176	<i>В.И. Шахматова, А.В. Яковлев, Г.Ф. Ситдикова</i> Развитие кортикальной депрессии в соматосенсорной коре крыс в условиях гипергомоцистеинемии	183
<i>Н.М. Ткаченко, А.В. Гладков, И.В. Мухина</i> Возраст-зависимые изменения нейросетевой активности клеток гиппокампа при разрушении внеклеточного матрикса мозга ...	177	14 ОКТЯБРЯ 2020	
<i>А.М. Трофимова, Т.Ю. Постникова, А.В. Зайцев</i> Отсроченные изменения синаптической потенциации в гиппокампе крыс после пентилентетразол-индуцированного эпилептического статуса	178	КЛЕТочная и молекулярная биология одноклеточных организмов	
<i>В.Ф. Хузахметова, А.Н. Ценцевицкий, Э.А. Бухараева</i> Влияние адреналина на синаптическую передачу в нервно-мышечном синапсе мыши с моделью бокового амиотрофического склероза	178	<i>М.Е. Белоконь, Н.А. Бородин, В.Р. Хабибулина, М.С. Мелехин</i> Сосущая инфузория <i>ophryodendron abietinum</i> . Морфологический и молекулярный анализ, новые сведения о жизненном цикле	184
<i>Т.А. Хунагов, К.В. Скобелева, Е.В. Казначеева</i> Нарушение депо-управляемого кальциевого входа в нейронах гиппокампа <i>5xfad</i> мышей моделирующих наследственную форму болезни Альцгеймера	179	<i>М.А. Бердиева, И.А. Поздняков, В.О. Калинина</i> Идентификация белков, ассоциированных с сингамией и мейозом, в транскриптоме динофлагеллят <i>prorocentrum minimum</i>	184
<i>Д.В. Чернопольская, Д.Р. Еникеев, Е.В. Герасимова, А.В. Захаров</i> Эффекты гомоцистеина на электрическую активность в гиппокампе крыс <i>in vivo</i>	179	<i>С.С. Бутенко, Д.М. Есюнина, М.А. Простова</i> Исследование коротких белков-аргонавтов прокариот	185
<i>М.В. Черныш, В.В. Гусельникова, Д.Э. Коржевский</i> Особенности распределения фермента глутаминсинтетазы в клетках головного мозга кролика	180	<i>Е.Н. Волкова, А.А. Кудрявцев</i> Молекулярно-филогенетические отношения амёб <i>neoparamoeba</i> , <i>paramoeba</i> (amoebozoa, dactylopodida), <i>janickina</i> (incertae sedis) и их симбионта <i>perkinsela</i> -подобного организма	185
		<i>А.В. Герцен, К.П. Чаленко, Д.Д. Недорезова, Д.М. Колпащиков, Е.И. Кошель</i> Разработка стратегии борьбы с антибиотикорезистентными штаммами бактерий на основе использования днк — наномашин	186

А.Б. Гринев, Н.Ю. Фокина Полногеномный сравнительный анализ изолятов <i>plasmodium falciparum</i> , выделенных в географически удаленных регионах 187	D.S. Kireeva, A.N. Ignatieva, S.M. Malyshev, Y.S. Tokarev, I.V. Issy М.Д. Лаврова, А.А. Агапов, А.В. Кульбачинский Влияние gre-подобных белков стрессоустойчивой бактерии <i>deinococcus</i> <i>gobiensis</i> на транскрипцию 193
А.Н. Гринько, В.Ю. Филина, Е.В. Ермилова Функции усеченных гемоглобинов 1 и 2 одноклеточной зеленой водоросли <i>chlamydomonas reinhardtii</i> 187	К.Н. Лотонин, И.А. Удалов Соотношение морфологического и «молекулярного» вида амёб семейства <i>paramoebidae</i> 193
Е.И. Гулк, Е.Б. Замяткина, В.С. Лемешева, Е.Р. Тараховская Влияние экзогенных органических субстратов на метаболизм <i>euglena gracilis</i> 188	С.А. Малявин, Л.А. Шмакова Конфликт молекулярных филогений рода <i>acanthamoeba</i> (амебозоа) может быть связан с внутригеномным полиморфизмом 18s 194
В.А. Деркач, Ж.М. Залуцкая, Е.В. Ермилова Регуляция синтеза пролина одноклеточной зеленой водорослью <i>chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> в стрессовых условиях 188	О.В. Матанцева, М.А. Бердиева, В.О. Калинина, И.А. Поздняков, С.А. Печковская, П.Ю. Сафонов Физиология динофлагеллят во время перестройки клеточных покровов 194
В.В. Долгих, С.А. Тимофеев, В.С. Журавлев, И.В. Сендерский Современные методы изучения взаимоотношений микроспоридий с зараженной клеткой хозяина и борьбы с внутриклеточными паразитами 189	Е.С. Мезенцев, О.Г. Камышацкая, А.В. Смирнов Разнообразие структурной организации ядра амеб семейства <i>thecamoebidae</i> (амебозоа: <i>discosea</i>) 195
В.С. Журавлев, С.А. Тимофеев, В.В. Долгих Конструирование и отбор рекомбинантных одноцепочечных антител к гексокиназе микроспоридии <i>poseta bombycis</i> 189	Т.И. Миронов, А.Ю. Яковлев, С.И. Черныш, Е.В. Сабанеева Стабильность симбиотической системы инфузория <i>paramecium multimicronucleatum</i> / бактерия <i>ca. Trichorickettsia mobilis</i> при воздействии противобактериальными агентами 195
С.В. Иванова, Т.Г. Шапошникова, К.А. Бенкен, Е.В. Сабанеева Выявление актина, ассоциированного с ядерным компартментом инфузорий (ciliophora) 190	И.А. Морозов, А.П. Годовалов Влияние микробных полиаминов на функциональную активность фагоцитирующих клеток 196
П.А. Иванов-Ростовцев D-self моделирование устойчивости роста дрожжей <i>saccharomyces cerevisiae</i> при корреляции активностей углекислоты и гликогена <i>gboу оц "протон", москва, россия</i> .. 190	В.А. Мусарова, Д.С. Матюшкина, Т.В. Григорьева, И.О. Бутенко, В.М. Говорун Транскриптомный и протеомный анализы бактерии <i>escherichia coli</i> после обработки секреторными <i>iga</i> 197
В.О. Калинина, М.А. Бердиева, Е.В. Ломерт, С.О. Скарлато Влияние недостатка азота и фосфора на жизненный цикл динофлагеллят <i>prorocentrum minimum</i> (dinophyceae) 191	М.М. Орехова, В.В. Белоусова, Н.Е. Морозова, И.Е. Вишняков, М.В. Якунина Регуляция ранней транскрипции у гигантского бактериофага <i>phikz</i> 197
О.Г. Камышацкая, Е.С. Мезенцев, О.Ю. Гордецкая, А.В. Смирнов, Е.С. Насонова Особенности тонкого строения <i>paramicrosporidium vannellae</i> (opisthokonta: <i>rozellomycota</i>) — внутриядерного паразита амеб <i>vannella</i> sp 191	Д.А. Падий, Н.А. Шевченко, В.А. Плюта Устойчивость бактериальных клеток к наночастицам серебра при действии летучих органических соединений, синтезируемых бактериями; роль глобальных регуляторных генов 198
Д.С. Киреева, А.Н. Игнатьева, С.М. Малыш, Ю.С. Токарев, И.В. Исси Молекулярно-генетическая диагностика микроспоридий, собранных в середине прошлого века 192	

С.А. Печковская, Н.А. Князев, С.О. Скарлато, Н.А. Филатова Синтез белка теплового шока 32 кДа в ответ на соленостный стресс формирующих вредоносные цветения инвазивных динофлагеллят <i>prorocentrum minimum</i> 198	Е.А. Слуцкая, Н.Н. Случанко, Е.Г. Максимов, А.В. Степанов Генетически кодируемый флуоресцентный сенсор температуры, основанный на фотоактивном оранжевом каротиноидном белке 203
И.А. Поздняков Возникновение электровозбудимости у эукариот в свете эволюции ионных каналов суперсемейства p-loop 199	Д.В. Тихоненков (Фило)геномные и ультраструктурно- морфологические исследования новых макротаксонов гетеротрофных протистов и их эволюционная важность 203
И.С. Приходько, О.Н. Щепин, Г. Морено, А. Лопез- Виллалба, Ю.К. Новожилов, М. Шниттлер Ревизия рода <i>lepidoderma</i> de bary (didymiaceae, тухомыцетес) с использованием методов молекулярной филогении 200	Е.В. Фролова, Г.Г. Паскерова, А.В. Смирнов, Е.С. Насонова Четыре гиперпаразита на одного хозяина: разнообразие стратегий развития мечниковеллид, изолированных из кишечных грегарин полихеты <i>rugosprio elegans</i> 204
Н.А. Румянцева, А.Д. Ведяйкин, И.Е. Вишняков Новые данные о регуляции деления при sos- ответе в <i>escherichia coli</i> 200	О.А. Цаплина, Е.С. Божокина Изменение экспрессии поверхностных белков m-hela в ответ на заражение бактериями 204
А.Р. Садовская, А.Б. Китаева, В.Е. Цыганов Исследование организации тубулинового цитоскелета в клетках детерминированных клубеньков сои культурной (<i>glycine max</i> L.) И лядвенца японского (<i>lotus japonicus</i> L.) 201	Е.А. Цой, Г.Ю. Фисунов, Д.В. Евсютина, И.А. Гаранина, В.А. Манувера, В.М. Говорун Бактериальный транскрипционный фактор whia образует петлю обратной связи между трансляцией и энергетическим метаболизмом 205
П.Ю. Сафонов, А.В. Хютти, И.А. Поздняков Cnbd-содержащие ионные каналы эукариотных микроорганизмов: разнообразие и идентификация 201	Л.А. Шмакова, С.А. Малявин, М.В. Молчанов Состав низкомолекулярных осмолитов в клетках штамма <i>acanthamoeba</i> sp. Из плейстоценовой мерзлоты по данным ямр- спектроскопии 205
Д.Е. Сидорова, В.А. Плюта, И.А. Хмель. Летучие органические соединения, продуцируемые микроорганизмами: биологическая активность и влияние на quorum sensing системы регуляции 202	Ю.А. Яковлева, Е.С. Насонова, Н.А. Лебедева, А.А. Потехин, А.Э. Вишняков, Н.И. Бондаренко, Е.В. Сабанеева Микроспоридии инфузорий рода <i>ragametesium</i> . 206

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

СТРУКТУРА ЖУРНАЛА

Журнал состоит из нескольких разделов: «Обзоры», «Оригинальные исследования», «Дискуссионные и общетеоретические работы», «Stem cells business», «От редакции», «История».

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Правила представления рукописей: Для опубликования принимаются работы по всем рубрикам журнала, оформленные в соответствии с требованиями журнала.

Электронный вариант статьи на диске с полуторными интервалами между строчками, со стандартными полями (слева — 3 см, справа — 1 см, сверху и снизу — 2,5 см) должны быть отправлены по адресу:

1 19333 г. Москва, ул. Губкина, д. 3, стр 2, а/я 373.

Тел.: +7 (495) 646-80-76

Кроме того, все работы могут быть посланы по электронной почте, по адресу: redaktor@celltranspl.ru.

Все страницы, кроме титульного листа, должны быть пронумерованы (вверху в центре). Рукописи, оформление которых не соответствует «Правилам для авторов», могут быть отклонены редакцией. Материалы, уже опубликованные в других изданиях, или находящиеся на рассмотрении в других редакциях, будут отклонены редколлегией журнала.

Титульный лист: На титульном листе должны быть указаны фамилии и инициалы всех авторов, название статьи, место работы (наименование кафедры или лаборатории и учреждения, где выполнена работа), 5–10 ключевых слов. Оригинальные исследования должны быть завизированы руководителем учреждения, где выполнена работа.

Резюме: Все статьи должны содержать резюме на русском и английском языках объемом не более 250 слов (редколлегия имеет право сокращать резюме, превышающие указанный объем). В резюме должны быть изложены цели исследования, основные процедуры (отбор объектов изучения или лабораторных животных, методы наблюдения или аналитические методы), основные результаты (по возможности, конкретные данные и их статистическая значимость) и основные выводы.

Текст: Текст необходимо печатать в редакторе Word на бумаге формата А4, шрифтом Times New Roman, 14 размера, без переносов. Все страницы должны быть пронумерованы вверху в центре. Материал и методы исследования должны быть описаны детально с точным указанием использованных реактивов, фирмы изготовителя и страны. Если в статье имеется описание наблюдений на человеке, не следует использовать фамилии, инициалы больных или номера историй болезни, особенно на рисунках и фотографиях. Кроме того, в таких статьях необходимо указывать, подписывал ли больной информированное согласие, есть ли одобрение этического комитета

и ученого совета учреждения, где данное исследование было выполнено. Статьи, не содержащие этой информации, будут отклонены редакцией.

При изложении экспериментов на животных следует указать, соответствовало ли содержание и использование лабораторных животных правилам, принятым в учреждении, рекомендациям национального совета и национальным законам.

Последняя страница: На последней странице надо поставить подписи всех авторов, указать полностью их фамилии, имена, отчества, ученую степень, а также почтовый адрес, телефон/факс, электронный адрес автора, с которым следует вести переписку.

Иллюстрации: Журнал принимает в качестве иллюстраций оригинальные схемы, фотографии, микрофотографии и графики. Все рисунки и графики должны быть присланы отдельными файлами в формате tiff с первоначальным разрешением 300 dpi, линейным размером по ширине не менее 7 см. Обозначения допускаются только в распечатанном варианте или в копиях рисунков. Графики должны быть выдержаны в серо-зеленой гамме. За качество воспроизведения несоответствующих требованиям иллюстраций редакция ответственности не несет, либо они исключаются.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

Библиографические ссылки в тексте: все ссылки должны быть процитированы в тексте и пронумерованы последовательно, в порядке их первого упоминания в тексте, арабскими цифрами в квадратных скобках, в соответствии со списком литературы, данным в конце статьи.

Список литературы: при цитировании необходимо использовать номенклатуру названий журналов, рекомендованную Index Medicus в формате NLM — список названий может быть получен в NLM (<http://www.nlm.nih.gov>). Цитирование по системе автор-дата не допускается.

Должны быть упомянуты все авторы; в случае, если авторов пять или больше, перечислите первых трех и добавьте «и соавт.» (et al.). Авторский коллектив несет полную ответственность за точность и полноту всех ссылок и за правильность цитирования в тексте.

Примеры цитирования различных литературных источников

Журнальная статья:

Vega K.J., Pina L, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pan-creatobiliary disease. *Ann. Intern. Med.* 1996; 124(II): 980–3.

Если в томе сохраняется последовательная нумерация страниц, номер журнала можно не указывать:

Vega K.J., Pina L., Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann. Intern. Med.* 1996; 124: 980–3.

Организация в качестве автора:

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med. J. Aust. 1996; 164: 282–4.

Автор не указан:

Cancer in South Africa [editorial]. S. Afr. Med. J. 1994; 84: 15.

Том с приложением:

Shen H.M., Zhang Q.F. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. Environ Health Perspect. 1994; 102 Suppl 1: 275–82.

Том, разделенный на части:

Ozben T., Nacitarhan S., Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. Ann. Clin. Biochem. 1995; 32(Pt 3): 303–6.

Журнал, номера которого не объединяются в тома:

Turan L., Wredmark T., Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. Clin. Orthop. 1995; (320): 110–4.

Физические лица в качестве авторов книги:

Ringsven M.K., Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Редакторы, составители в качестве авторов книги:

Norman I.J., Redfern S.J., editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Организация в качестве автора и издателя:

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

Глава в книге:

Phillips S.J., Whisnant J.P. Hypertension and stroke. In: Laragh J.H., Brenner B.M., editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465–78.

Материалы конференции:

Kimura J., Shibasaki H., editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15–19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

Доклад на конференции:

Bengtsson S., Solheim B.G. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun K.C., Degoulet P., Piemme T.E., Rienhoff O., editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6–10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561–5.

Научный или технический отчет:

Smith P., Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSI-GOEI69200860.

Диссертация:

Kaplan S.J. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

Патент:

Larsen C.E., Trip R., Johnson C.R., inventors; No-voste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Кодекс Федеральных правил:

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Словари и аналогичные издания:

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p. 119–20.

Классическая литература:

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13–16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

Неопубликованные материалы / Материалы в печати:

Leshner A.I. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. In press 1996.

Публикация из Internet:

Poddubny I.V., Vasiliev A.V., Faizullin A.K. et al. Tissue engineering reconstruction of urethra in children suffering severe hyposplodias: experimental and clinical findings. [http://celltranspl.ru/journal/experim/?MESSAGES\[1\]=SHOW_PUBLICATION&PUBLICATION_ID=806](http://celltranspl.ru/journal/experim/?MESSAGES[1]=SHOW_PUBLICATION&PUBLICATION_ID=806).

РАЗМЕР РУКОПИСИ**Обзорные статьи:**

не более 30 страниц машинописного текста.

Оригинальные исследования:

не более 15 страниц машинописного текста.

Исторические статьи:

не более 15 страниц машинописного текста.

ПОДГОТОВКА СТАТЬИ К ПУБЛИКАЦИИ

Редакция имеет право вести переговоры с авторами по уточнению, изменению или сокращению рукописи. Все присланные материалы по усмотрению редколлегии направляются для рецензирования членам редакционного совета или экспертам-консультантам в данной области. Принятые статьи публикуются бесплатно. Рукописи и оттиски статей авторам не высылаются. Редакция оставляет за собой право вносить в текст рукописей, принятых к опубликованию, терминологические, стилистические и грамматические правки, изменять количество и корректировать иллюстрации и таблицы. После опубликования в журнале «Гены & клетки» материалы могут быть размещены на сайте <http://www.celltranspl.ru>.

Редакция журнала в обязательном порядке заключает с авторами договор о передаче авторских прав. Образец договора находится на сайте журнала.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

JOURNAL STRUCTURE

The journal includes several sections such as «Reviews», «Original Research», «Discussion and Theoretical Background», «Stem cells business», «Editorial's», «History».

GENERAL INSTRUCTIONS

Submission: Contributions to any aspect the journal covers that meet the requirements are accepted for publication.

Manuscripts must be sent to 119991 Moscow, Gubkina st. b. 3-2.

Tel. +7 (495) 646-80-76 in two copies and on disc, 1.5 line spaced with 3-cm left, 1-cm right and 2,5-cm top/bottom margins.

Besides, manuscripts except the original research may be submitted by e-mail redaktor@celltranspl.ru.

All pages except the title page should be numbered (at the upper center). Manuscripts could be returned shelved to the authors unless they satisfy the General Instructions requirements. Materials published elsewhere or being under consideration by another journals will be rejected.

Title page: The title page should include the names of all the authors, a short running title, affiliations (names of department[s]/ laboratory[ies] and institution[s] where the work was done), 5 to 10 key words. The name, the highest academic degrees of the institution head should be provided within the brackets. The original investigation reports must be proved by the head of the institution where the study is held.

Abstract: A 250-word abstract should be provided for all articles. [The editorial department will edit abstracts that are too long.] The abstracts should include the aims of investigation, general procedures (selection of objects to be studied or laboratory animals, methods of investigation or analysis), results (specific findings and their statistical significance), and conclusion. Abstract will be translated into Russian by the publisher's editorial department.

Text: The text should be a Word-processed A4 format document in the 14-th Times New Roman font without hyphens. All pages should be numbered in the upper center. Complex formulae and citations should be signed on the margins by authors. Materials and methods of the investigation should be described in details, with the proper names of reagents used, their producers and country. In case reports, patients' names, history identifications especially in pictures or photographs should be omitted. In case of people participation in the clinical research, provide the information if they signed the informed consent as well as is there is the approval of the ethic committee and that of the scientific board of the institution where this investigation was performed. Manuscripts that do not provide this information will be rejected.

In case of reports on experimental animals, indicate if the experiment was held according to the rules of keeping and handling experimental animals accepted in your institution, the national laws and the international regulations.

Last page: The last page should include the signatures of all the authors, their full names, the highest academic degrees and the corresponding author's complete mailing address, telephone/fax and e-mail.

Illustrations: As illustrations original schemes, pictures, micrographics, diagrams are accepted for publication. All the pictures and diagrams should be provided as separate files in a tiff format with the primary resolution of 300 dpi and the linear width of not less than 7 cm. Legends are acceptable only on a printed copy or on picture copies. Diagrams should be grey and green.

The edition does not guarantee a high quality of reproduction of inappropriate illustration(s), and reserves the right not to reproduce an illustration(s) unless its quality meets the editorial requirements.

REFERENCES

Citation in text: All references should be cited in the text and numbered consecutively using Arabic numbers in square brackets in accordance with the list given in the end of the article.

Reference list: Presentation of the references should be based on NLM formats in Index Medicus. The author-date system of citation is not acceptable. Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus. The list of Index Medicus — indexed journals could be obtained at NLM (<http://www.nlm.nih.gov>). All authors should be listed; if there are five authors and more, only the first three should be listed, followed by «et al.». Authors bear total responsibility for the accuracy and completeness of all references and for correct text citation.

SPECIFIC FORMATS

Review articles:

not more than 30 pages of typewritten text.

Original research:

not more than 15 pages of typewritten text.

Historical material:

not more than 15 pages of typewritten text.

EDITORIAL ASSESSMENT AND PROCESSING

The editorial department reserves the right to consult the authors about refinement, modifying or shortening manuscripts. All contributions to the journal could be peer reviewed by members of the Editorial Board or submitted to expert consultants at the discretion of the editorial department. Accepted materials are published free of charge. Manuscripts and facsimile copies are not returned to the authors. Having been published in «Genes & Cells» materials will be published at <http://www.genescells.com>.



ИНСТИТУТ
СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА



ПАО «ИСКЧ» (Институт Стволовых Клеток Человека) — российская многопрофильная биотехнологическая компания, основанная в 2003 году.

Направления деятельности ИСКЧ — научные исследования, разработка, а также коммерциализация и дальнейшее продвижение на рынке собственных инновационных лекарственных препаратов и высокотехнологичных медицинских услуг.

Компания ставит целью формирование новой культуры медицинской заботы о человеке — развитие здравоохранения в области персонализированной и профилактической медицины.

Проекты ИСКЧ охватывают следующие сегменты современных биомедицинских технологий:



генная терапия



регенеративная медицина (клеточные сервисы и препараты, тканеинженерные продукты)



медицинская генетика, в т. ч. репродуктивная (генетическая диагностика и консультирование)



биострахование



биофармацевтика (в рамках международного проекта «СинБио»)

ИСКЧ принадлежит банк персонального хранения стволовых клеток пуповинной крови Гемабанк® — крупнейший в РФ и СНГ, а также банк репродуктивных клеток человека — Репробанк® (персональное хранение и донация).

Компания вывела на рынок первый российский генотерапевтический препарат для лечения ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза — Неоваскулген®, а также инновационную медицинскую технологию применения дермальных аутофибробластов для восстановления кожи с признаками возрастных и иных структурных изменений — SPRS-терапия®.

ИСКЧ реализует социально-значимый проект по развитию лаборатории и сети медико-генетических центров Genetico® для предоставления

услуг генетической диагностики и консультирования с целью раннего выявления и профилактики наследственных заболеваний, а также патологий с генетической составляющей (включая преимплантационную генетическую диагностику, неинвазивное пренатальное тестирование, а также сервисы в области онкогенетики и биоинформатики на основе NGS /расшифровка генома человека и его интерпретация, диагностические панели на отдельные категории и случаи заболеваний).

Компания развивает свои продукты и услуги как на российском, так и на международном рынке.

ИСКЧ — первая публичная биотехнологическая компания в России, эмитент сектора РИИ Московской Биржи (тикер: ISKJ).



www.hsci.ru



+7 (495) 646-80-76



www.genescells.ru