

ТРУДЫ
63-Й ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ МФТИ
23-29 НОЯБРЯ 2020
БИОЛОГИЧЕСКАЯ
И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

Министерство науки
и высшего образования
Российской Федерации

Московский
физико-технический институт
(национальный
исследовательский университет)



Москва
Долгопрудный
Жуковский
2020

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»

ТРУДЫ

63-й Всероссийской научной конференции МФТИ

23–29 ноября 2020

Биологическая и медицинская физика

Москва – Долгопрудный – Жуковский

МФТИ

2020

УДК 61:53:57
ББК 51:22.3:28.07
Т78

Т78 **Труды 63-й Всероссийской научной конференции МФТИ
23–29 ноября 2020 года. Биологическая и медицинская физика. —**
Москва : МФТИ, 2020. — 143 с.
ISBN 978-5-7417-0758-6

Включены результаты оригинальных исследований студентов, аспирантов, преподавателей и научных сотрудников МФТИ и дружественных учебных и научных организаций. Статьи представляют интерес для специалистов, работающих в области биологической и медицинской физики.

УДК 61:53:57
ББК 51:22.3:28.07

ISBN 978-5-7417-0758-6

© Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования «Московский физико-технический
институт (национальный исследовательский
университет)», 2020

Содержание

Программный комитет конференции.....	7
Организационный комитет конференции	8
СЕКЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ И ГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ	9
Анализ и предсказание эффекта коротких инделов в белках	10
Влияние вышестоящих регуляторных регионов и промоторов на связь между бактериофагами и их хозяевами.	12
Влияние спектрального состава света на образование флавонов в <i>in vitro</i> культурах <i>Scutellaria baicalensis</i> GEORGI	13
Выбор и получение объектов для разработки методики определения генотоксичности с использованием высокопроизводительного секвенирования	15
Выявление возбудителей острых кишечных инфекций человека методом высокопроизводительного секвенирования.....	16
Выявление новых генетических локусов, ассоциированных с эндотелиальной дистрофией роговицы Фукса	17
Идентификация молекулярной эволюции человека с помощью генных сетей	19
Изменение врожденного иммунитета астроцитов в ответ на метаболические адаптации	20
Изучение вклада фосфолипазы PLA2G16 в эффективность репликации непатогенных онколитических энтеровирусов	21
Изучение пролиферативной активности фибробластов на полимерных матриксах из биоразлагаемых полимеров	23
Инфекционные процессы бактериофага ϕ 24B	23
Исследование роли нерецепторных киназ семейства Src в прогрессии злокачественных заболеваний	25
Метаболические изменения в гепатоцитах при инфекции вирусом гепатита С: исследование в физиологической среде	26
Метилирование ДНК как фактор, ассоциированный со стабильностью генома	28
Неравновесная модель короткодействующей репрессии при регуляции транскрипции генов	29
Обнаружение нового представителя рода <i>Atadenovirus</i> в биологических образцах позвоночных с использованием методики, подобной метабаркодингу	30
Оптимизация метаболизма <i>Escherichia coli</i> для продукции яблочной кислоты по оксидативной ветви цикла трикарбоновых кислот из глюкозы	31
Нокаут сиалитрансфераз, как стратегия формирования резистентности к вирусу гриппа А.....	33
Оптимизация протокола идентификации CNV по данным.....	34
экзомного секвенирования	34
Поиск новых интеракторов P73 при помощи проксимального мечения	34
Полиморфизмы генов FAD3, определяющие содержание линоленовой кислоты в льняном масле, и тест-система для их идентификации	35
Получение высококачественной сборки генома тополя <i>Populus x sibirica</i> для определения структуры полового локуса	37

Получение полноразмерного функционального никотинового рецептора типа $\alpha 7$ в клетках HEK293	39
Системы DGR в антивирусном иммунитете бактерий	41
Стабильность бактериофагов в сыворотке крови	42
Филогенетический анализ компенсированных болезнетворных мутаций у человека	44
Функциональная аннотация протеоформ человека, образованных в результате альтернативного сплайсинга, путем анализа интерактомной карты, построенной на основе AP-MS данных	46
Характеристика биологических свойств и особенностей организации генома бактериофага, специфически инфицирующего <i>Acinetobacter baumannii</i> капсульный тип 47	47
СЕКЦИЯ ФИЗИКИ ЖИВЫХ СИСТЕМ	49
Анализ стабильности люциферазы светляков <i>Luciola mingrelica</i> при денатурации мочевиной ...	49
Способ моделирования и классификации патологий миокарда на основе новых представлений о магнитофизике миокарда	51
Воздействие магнитной гипертермии опосредованной наночастицами оксида железа на жизнеспособность клеток рака молочной железы MDA-MB-231	52
Доступная система для оптического картирования с открытым программным обеспечением	53
Измерение активационных характеристик быстрых натриевых каналов кардиомиоцита человека при физиологической температуре	55
Изучения полиморфизма генов ожирения у студентов ИАТЭ	56
Исследование формирования сердечной ткани при патологических условиях	58
Исследование характеристик МРТ-совместимого составного магнита для кохlearной имплантации.	60
Липид-белковый синергизм в морфологии биологических мембран	61
Модельная система имплантации кардиальных клеток с помощью полимерных микроволокон	62
Оценка геропротекторной активности производных Витаферина-А на модели нематод <i>Caenorhabditis elegans</i> с применением инновационных компьютерных технологий и устройств	64
Получение области возникновения реентри на моно слоях желудочковых кардиомиоцитов с помощью математического моделирования	65
Разработка алгоритма кодирования звука для системы кохlearной имплантации	66
Синтез и физико-химическое исследование димерных наночастиц магнетит-золото	67
Технология выделения клеток из нематод <i>Caenorhabditis elegans</i> -модельных объектов для изучения воздействия космической радиации на живые организмы	69
Технология регистрации нейронной активности при помощи миниатюрного флуоресцентного микроскопа в исследовании нейронно-сетевых механизмов пластичности	70
Экспериментальное обоснование тополого-физиологической модели электропроводящей системы сердца, основанной на новых представлениях об анатомии миокарда	71
Активность нейронов височной коры и гиппокампа в периоды центрального апноэ сна у кошек	72
СЕКЦИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ	75
Адресные противораковые наночастицы полилактид-ко-гликолида, загруженные фотосенсибилизаторами, для детекции и фотоиндуцируемой элиминации HER2-сверхэкспрессирующих опухолей	75
Active compounds extracted from <i>Hermetia illucens</i> larvae fat inhibit phytopathogenic bacteria	76

Бактерицидный порошковый материал медицинского назначения	78
Биосовместимые наночастицы Ge, полученные методом фемтосекундной лазерной абляции....	79
Блокировка макрофагов наночастицами <i>in vivo</i> в различных иммунных состояниях	80
Виртуальный скрининг флавоноидов как ингибиторов папаиноподобной протеазы коронавируса SARS-CoV-2.....	81
Включение НПВС в металлоорганические каркасы на основе γ -циклодекстрина.....	82
Влияние ионов ртути на способность <i>Chlorella vulgaris</i> образовывать колонии клеток.....	84
Влияние нуклеотидной последовательности фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов на их гибридизационные свойства и структуру дуплексов.....	86
Влияние рекомбинантного белка Slurp-1 на рост и миграцию клеток первичных линий меланомы.....	87
Детонационные наноалмазы: возможность применения в препаратах фотодинамической терапии.....	90
Изучение биологической деградации наноструктурированных полимерных материалов.....	90
Изучение фотодинамической активности фталосенса на модели нематод <i>C. elegans</i>	92
Воздействие магнитной гипертермии опосредованной наночастицами оксида железа на жизнеспособность клеток рака молочной железы MDA-MB-231	94
Иммобилизация урана в полисахаридном матриксе микробных биопленок при <i>in situ</i> биоремедиации водоносных горизонтов вблизи шламохранилищ	95
Инновационный метод контроля серосодержащих соединений в пищевых продуктах	97
Исследование антиоксидантной активности экстрактов плодов рябины обыкновенной методом биотестирования.	98
Исследование взаимодействия эмолина с модельными липидными мембранами	100
Исследование донорно-акцепторных свойств тиосемикарбазона Dp44mT и его комплексов с ионами Zn в фотохимических реакциях методами ЯМР и ХПЯ	100
Исследование степени биodeградации полимерного покрытия барьерного типа, модифицированного биоцидами.....	101
Исследование формирования липид-детергентных частиц в смесях трифторэтанол-вода	103
Капсулированная форма доцетаксела для адресной доставки в раковые клетки	104
Липидная нанотрубка как нанофлюидное устройство для детекции одиночных молекул	105
Механоиндуцируемая клеточная гибель, вызванная низкочастотным высокоградиентным магнитным.....	106
Многофункциональные биосовместимые наночастицы для фототермической терапии.....	107
Многофункциональные наноагенты на основе углеродных квантовых точек и суперпарамагнитных наночастиц	108
Молекулярное моделирование и атеропротекторные свойства производного хинолин-4-он 3-оксобутаноата <i>in vivo</i>	109
Наночастицы магнетита для терапии HER2-положительных опухолей.....	111
Наночастицы серебра как потенциальный.....	112
Новые синтетические агонисты никотиновых ацетилхолиновых рецепторов: молекулярный дизайн и активность <i>in vitro</i>	114
Новый атмосферный источник ионов для быстрого профилирования биологических объектов на основе ионизации электрораспылением	114

Окислительно-восстановительная активность хелатных комплексов тиосемикарбазона Dp44mT в реакциях перекисного окисления липидов.....	116
Определение олигомерного состояния белка по АСМ-данным	117
Оценка биодоступности метформина в условиях модельного липидного бислоя и при изменении диеты экспериментальных животных.....	119
Оценка действия гамма-излучения на содержание малонового диальдегида в проростках ячменя посевного (<i>Hordeum sativum</i>).....	120
Разработка вычислительной среды для моделирования минерального состава природной воды	121
Разработка многофункциональных наноагентов для биовизуализации на основе BRET между люциферазой и квантовыми точками.....	123
Разработка прибора и программного обеспечения для обработки экспериментальных данных по изучению воздействия космических лучей на нематоды <i>Caenorhabditis elegans</i>	125
Роль нативно неупорядоченных белков в процессах старения	125
Роль трансмембранного домена в автофосфорилировании рецептора, подобного рецептору инсулина (IRR)	127
Серебряные наночастицы для адресной фототермической терапии раковых заболеваний.	128
Система адресной доставки лекарственных средств на основе MIL-101 (Fe)	129
Создание тест-системы, основанной на микобактериальных Mmp5-MmpL5 транспортерах, для скрининга потенциальных антимикобактериальных препаратов.....	130
Сравнение и анализ различий биологических свойств магнитных наночастиц <i>in vitro</i>	131
Структурное разнообразие и динамика «трехпетельных» белков человека по данным ЯМР-спектроскопии.....	132
Флуоресцентные свойства серебряных нанокластеров, стабилизированных цитозин-богатой нитью ДНК, комплементарной G-квадруплексу	134
Фотосенсибилизаторы I типа на основе фуллерена [60] и производных хлориновых и цианиновых красителей	135
Эволюция тубулина: выявление молекулярной основы динамической нестабильности бактериальных тубулинов.	136
Электропроводящий гидрогель на основе PEDOT:PSS.....	138
Электроспиннинг матриц с регулярным рельефом для изучения морфологии кератиноцитов линии HaCaT.....	139
Электрохимические редокс-потенциалы нитроксильных производных биополимера хитозана по данным молекулярно-динамического моделирования и квантово-химических расчетов	140

Программный комитет конференции

Н.Н. Кудрявцев, ректор МФТИ – председатель

В.А. Баган, проректор по научной работе – заместитель председателя

А.А. Воронов, проректор по учебной работе, и.о. директора ЛФИ

Е.А. Белянко, директор ФРКТ

С.С. Негодяев, директор ФАКТ

В.В. Иванов, директор ФЭФМ

А.М. Райгородский, директор ФПМИ

Д.В. Кузьмин, директор ФБМФ

П.А. Фориш, директор ИНБИКСТ

Организационный комитет конференции

Д.А. Диких, руководитель направления «Образование» ЦУП – председатель

С.О. Русскин, представитель ФРКТ

Е.Ю. Чиркина, представитель ЛФИ

Ю.А. Борисов, представитель ФАКТ

А.В. Шадрин, представитель ФЭФМ

Е.Г. Молчанов, представитель ФПМИ

Е.Е. Куликов, представитель ФБМФ

Е.И. Нехаева, представитель ИНБИКСТ

М.В. Костелева, представитель УНЦ ГСН

М.В. Кучеренко, представитель инновационно-технологического центра

Е.П. Яковлева, начальник отдела содействия трудоустройства выпускников

Е.Д. Жебрак, начальник отдела координации поисковых исследований

Секция клеточных и геномных технологий

Председатель: П.Ю. Волчков (к. б. н.), К.Ф. Хафизов (к. б. н.)

Зам. председателя: О.Н. Митяева (к. б. н.), И.В. Зубарев (к. б. н.)

Секретарь: А.А. Емельянова, А.С. Дух

Дата: 24.11.2020 и 25.11.2020 Время: 10:00

УДК 576.53

МУН11 и CCL11 - потенциальные маркеры опухоль-ассоциированных фибробластов, выявленные с помощью тотального и одноклеточного РНК секвенирования в различных типах рака

*А.Н. Казакова^{1,2}, К.С. Ануфриева^{1,2,3}, О.М. Иванова^{2,3}, В.О. Шендер^{2,3}, П.В. Шнайдер^{2,3},
Ж.Ж. Баймуханова², Г.П. Арапиди^{1,2}*

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России

³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

В настоящее время стромальное микроокружение опухоли (tumor microenvironment или TME) постепенно становится одним из главных объектов исследований в области онкологии. Многие работы утверждают, что развитие злокачественной опухоли на всех стадиях, включая метастазирование, сильно зависит от фибробластов, которые окружают раковую клетку (cancer-associated fibroblasts или CAF) [1–4]. CAF как обильная и активная популяция стромальных клеток в TME, влияют на развитие и прогрессирование опухоли. Однако ограничивающим фактором изучения опухоль-ассоциированных фибробластов является проблема их выявления среди всех клеток опухоли. Существующие гены-маркеры, с помощью которых в различных исследованиях выявляют опухоль-ассоциированные фибробласты, не универсальны для всех типов рака, кроме того, их экспрессия наблюдается и в других клетках опухоли, включая нормальные активированные фибробласты (NF) [1,5–9]. Поэтому в данной работе мы решили найти новые потенциальные гены-маркеры CAF на основе сравнительного мета-анализа экспрессии генов фибробластов, ассоциированных с раком, и нормальных фибробластов, а также анализа одноклеточного РНК-секвенирования опухоли.

Мы проанализировали изменения транскрипции генов по данным РНК секвенирования для 6 различных типов рака: рак желудка диффузного типа, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак молочной железы, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак предстательной железы. Было обнаружено, что большинство существующих генов-маркеров для идентификации CAF также экспрессируются в нормальных активированных фибробластах местной соединительной ткани опухоли. Также мы рассмотрели гены, экспрессия которых значимо изменилась в CAF относительно NF. Мы обнаружили, что найденные гены играют важную роль в ремоделировании внеклеточного матрикса, производстве фибриллярных коллагенов и формировании эластичных волокон. Кроме того, среди найденных генов мы обнаружили большое количество лигандов и рецепторов, в том числе парных, что может говорить о том, что CAF способны индуцировать образование новых сигнальных путей, направленных на сохранение их ассоциированного с раком фенотипа. Мы показали, что среди всех дифференциально представленных генов наиболее сонаправленное изменение экспрессии демонстрируют 6 генов: CCL11, МУН11, DIO2, ANOS1, CPA4, CDH6. Таким образом, найденные гены позволяют отличить опухоль-ассоциированные фибробласты от нормальных акти-

вированных. Чтобы рассмотреть экспрессию данных 6 генов в клетках опухоли и ее микроокружения, мы проанализировали 13 общедоступных наборов данных одноклеточного РНК-секвенирования опухоли для 9 различных типов рака. Было обнаружено, что среди предложенных маркеров гены MYH11 и CCL11 лучше всего позволяют выявить опухоль-ассоциированные фибробласты из всех клеток опухоли. Повышение представленности найденных нами маркеров было проверено при помощи RT-PCR в нормальных дермальных фибробластах и опухоль-ассоциированных фибробластов, полученных как из первичных линий, так при совместном культивировании нормальных фибробластов и раковых клеток. Согласно результатам биоинформатического анализа и нашим собственным экспериментальным данным, MYH11 и CCL11 можно рассматривать в качестве потенциальных маркеров опухоль-ассоциированных фибробластов.

Работа поддержана Грантом РНФ 19-75-10123 (экспериментальное подтверждение на клеточных культурах), Грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (биоинформатический анализ).

Литература

1. *Kalluri R.* The biology and function of fibroblasts in cancer // *Nat. Rev. Cancer.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 16, № 9. P. 582.
2. *Sahai E. et al.* A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts // *Nat. Rev. Cancer.* 2020. Vol. 20, № 3. P. 174–186.
3. *Grum-Schwensen B. et al.* Suppression of Tumor Development and Metastasis Formation in Mice Lacking the S100A4(mts1) Gene // *Cancer Research.* 2005. Vol. 65, № 9. P. 3772–3780.
4. *Ren L. et al.* Matrine suppresses breast cancer metastasis by targeting ITGB1 and inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition // *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2019.
5. *Berdiel-Acer M. et al.* Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information // *Mol. Oncol.* 2014. Vol. 8, № 7. P. 1290–1305.
6. *Bergers G., Song S.* The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance // *Neuro. Oncol.* 2005. Vol. 7, № 4. P. 452–464.
7. *Roberts E.W. et al.* Depletion of stromal cells expressing fibroblast activation protein- α from skeletal muscle and bone marrow results in cachexia and anemia // *J. Exp. Med.* 2013. Vol. 210, № 6. P. 1137–1151.
8. *Funa K., Sasahara M.* The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2014. Vol. 9, № 2. P. 168–181.
9. *Baril P. et al.* Periostin promotes invasiveness and resistance of pancreatic cancer cells to hypoxia-induced cell death: role of the $\beta 4$ integrin and the PI3k pathway // *Oncogene.* 2007. Vol. 26, № 14. P. 2082–2094.

УДК 575.224.22

Анализ и предсказание эффекта коротких инделов в белках

М. Зайченко^{1,2}, М.В. Молчанова¹, В.С. Новикова^{1,2}, В.Е. Раменский²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

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

Короткие инделы являются вторым самым распространенным типом полиморфизма человеческого генома после однонуклеотидных замен [1]. Первоочередный интерес представляют короткие инделы без сдвига рамки считывания в кодирующих участках генов (т.е. вызывающие вставку или удаление аминокислотных остатков), так как они могут влиять на структуру и функции производимого геном белка или, напротив, быть безвредными. Поскольку экспериментальная проверка влияния всех известных инделов без сдвига рамки считывания является невозможной, возникает потребность в разработке предсказательного метода, способного оценить патогенность таких инделов. Существующие на данный момент методы имеют ряд недостатков - часть существует исключительно в виде веб-серверов [2], что затрудняет их использование в пайплайнах анализа данных, более универсальные методы анализа вариантов полагаются на результаты работы аналогичных инструментов и не очень эффективны в предсказании именно инделов [3], третьи используют потенциально необъективные признаки для своих предсказаний, например, число упоминаний того или иного гена в научных публикациях [4]. При этом ни один инструмент не использует в должной мере информацию, содержащуюся в выравниваниях с гомологичными белковыми последовательностями.

Целью данного проекта является разработка методики расчета информативных признаков коротких (до 10 аминокислотных остатков) инделов без сдвига рамки считывания в белках для дальнейшего его использования в методе машинного обучения, способном классифицировать короткие инделы на болезнетворные и безвредные.

Для построения обучающей выборки инделов без сдвига рамки считывания использовалось два источника - база данных ClinVar (версия от октября 2019 г.) [5] и база данных gnomAD-exome (версия 2.1.1 liftover) [6]. В данной работе не рассматривались вставки и удаления, длина которых превышает 10 аминокислотных остатков. Всего в обучающий набор вошло 789 болезнетворных и 2009 безвредных инделов. Для построения выравниваний использовались полные протеомы животных (Eukaryotes, Animals), доступные в базе данных полных геномов NCBI [7]. После фильтрации было получено 618 протеомов с известными кодирующими последовательностями и общим количеством последовательностей не менее 100.

Был разработан метод двухступенчатого процесса построения точных локальных выравниваний. На первом шаге быстрый поиск гомологичных белков осуществляется программой BLASTP [8]. Затем используя полученный список гомологов с помощью алгоритма Смита-Ватермана программой water из пакета EMBOSS 6.6.0.0 [9] строятся точные локальные выравнивания последовательностей.

Для обработки выравниваний был разработан скрипт parse_markx10.py на языке Python 3.7.7. Основной задачей данной программы является сбор информации о выравнивании и поиск в нем вставок и удалений. Поиск инделов осуществляется поиском участков с инсерциями и делециями в двух выравненных белках относительно друг друга.

Была разработана система весов для идентификации схожести исследуемого индела и инделов, полученных из выравниваний. Всегда учитывается ближайший к исследуемому индел в выравнивании. Значения веса лежат на отрезке $[-1, 1]$, причем при точном совпадении вес индела в выравнивании равен одному, при пересечении с исследуемым инделом его значение больше нуля. Значение равное нулю вес принимает при стыковке с исследуемым инделом. При увеличении расстояния между инделами вес принимает значение меньше нуля и стремится к -1 и равняется -1 при отсутствии индела в исследуемом выравнивании. Для расчета информативных признаков была разработана программа score_indels.py на языке Python 3.7.7. Помимо этого, используются структурные признаки (вероятность неупорядоченного состояния, площадь, доступная растворителю, консервативность и т.д.), полученные в результате работы программы SPOT-D [10].

Для классификации инделов на безвредные и патогенные был разработан пилотный метод машинного обучения на основе алгоритма случайного леса, отдельно для делеций и инсерций (таблица 1).

Были получены распределения информативных признаков по классам и проведена их интерпретация (рис. 1).

Разработанный метод был протестирован на всех коротких белковых инделах, содержащихся в gnomAD и ClinVar.

Работа была поддержана грантом РФФИ No 18-04-00789.

*На тестовых данных	Инсерции	Делеции
N trees	100	
N features	10	12
Max depth	5	
Max features	7	5
AUC*	0.960	0.964
Sensitivity*	0.801	0.906
Specificity*	0.956	0.920
MCC*	0.748	0.813

Таб. 1: Результаты, полученные на разработанном методе машинного обучения

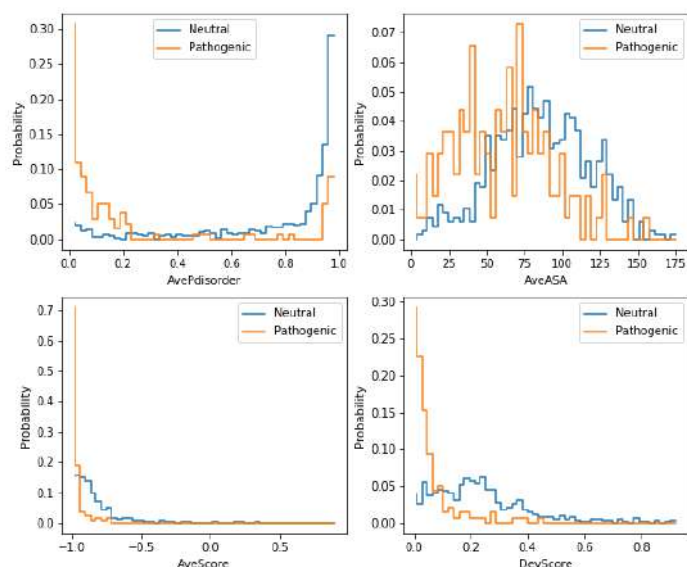


Рис. 1: Распределение некоторых признаков по классам инделов

Литература

1. *Sehn Jennifer K.* Insertions and deletions (Indels) // *Clinical genomics*. — Elsevier, 2015. — P. 129–150.
2. *Zhao Huiying et al.* DDIG-in: discriminating between disease-associated and neutral non-frameshifting micro-indels // *Genome biology*. — 2013. — Vol. 14, no. 3. — P. R23.
3. *Kircher Martin et al.* A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants // *Nature genetics*. — 2014. — Vol. 46, no. 3. — P. 310.
4. *Douville Christopher et al.* Assessing the pathogenicity of insertion and deletion variants with the variant effect scoring tool (VEST-Indel) // *Human mutation*. — 2016. — Vol. 37, no. 1. — P. 28–35.
5. ClinVar // URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
6. gnomAD // URL: <https://gnomad.broadinstitute.org/>.
7. NCBI Genome // URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>.
8. *Altschul Stephen et al.* Basic local alignment search tool // *Journal of molecular biology*. — 1990. — Vol. 215, no. 3. — P. 403–410.
9. *Rice Peter et al.* EMBOS: the European molecular biology open software suite. — 2000.
10. *Hanson Jack et al.* Improving protein disorder prediction by deep bidirectional long short-term memory recurrent neural networks // *Bioinformatics*. — 2017. — Vol. 33, no. 5. — P. 685–692.

УДК 578.56

Влияние вышестоящих регуляторных регионов и промоторов на связь между бактериофагами и их хозяевами

A. Zaragoza-Solas², Э. Шарафутдинов¹

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский институт)

²Evolutionary Genomics Group, отдел микробиологии

Бактериофаги (фаги) - это вирусы, которые избирательно поражают бактериальные клетки. Такая специфика обусловлена зависимостью фага от клеточного механизма хозяина, который нужен фагу для репликации и биосинтеза вирусных компонентов. Пример такой зависимости можно привести для фага T4. Во время транскрипции, ранняя конкуренция за РНК-полимеразу хозяина позволяет вирусу полностью захватить механизм репликации путем сигма-присвоения (sigma appropriation) [1]. Недавно показали [2], что фаги, которые заражают цианобактерии, кодируют ген фотосинтеза. Причём транскрипция этого гена реагирует на те же условия окружающей среды, что и ген, который кодируется у хозяина. Из этого можно предположить, что существует связь между регуляторными элементами фага и регуляторными элементами их хозяина. Это поможет лучше предсказывать взаимоотношения фаг-хозяин.

1) Цель работы:

- а) Найти связь между регуляторными элементами фага и регуляторными элементами хозяина.
- 2) Методы.
 - а) Исходный набор данных бактериофагов и пар бактерий был извлечен из базы данных Virus-Host (<https://www.genome.jp/virushostdb/>), который включает в себя все отношения фаг-хозяин, поддерживаемые культурами.
 - б) Геномы фагов и их хозяев были загружены из базы данных NCBI RefSeq
 - в) Обнаружение ORF проводилось с помощью программного обеспечения GeneMarks-2 [3]. Положение ORF затем использовалось для извлечения вышестоящих над ними регуляторных областей в геноме.
 - г) Общие мотивы мы выявили с помощью MEME suite[4].

Предварительные результаты были получены для части исследуемой выборки, в которой геномы 461 хоста и 2 983 фагов. В 80% случаев для регуляторных элементов из выборки геномов хостов было получено, что в геномах соответствующих им фагов есть мотивы, которые совпадают с ними с большой точностью. Следует отметить что в некоторых случаях для разных регуляторных элементов хоста было получено несколько мотивов, совпадающих с ними с большой точностью у одного фага.

Литература

1. Hinton D.M. Transcriptional control in the prereplicative phase of T4 development // Virology journal. 2010. V. 7. P. 289. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-289>
2. Puxty, R.J., Evans, D.J., Millard, A.D. et al. Energy limitation of cyanophage development: implications for marine carbon cycling // ISME J. 2018, 12, 1273–1286. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0043-3>
3. Lomsadze, A., Gemayel, K., Tang, S., & Borodovsky, M. Modeling leaderless transcription and atypical genes results in more accurate gene prediction in prokaryotes // Genome research, 2018. 28(7), 1079–1089. <https://doi.org/10.1101/gr.230615.117>
4. Bailey, T.L., Johnson, J., Grant, C.E., & Noble, W.S. The MEME Suite // Nucleic acids research, 2015, 43(W1), W39–W49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>
5. Rysak, A., Orlov, M., Zykova, E., Ermak, T., Sorokin, A. Bacterial promoter prediction: Selection of dynamic and static physical properties of DNA for reliable sequence classification // 2018 <https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0219720018400036>

УДК 581.1

Влияние спектрального состава света на образование флавонов в *in vitro* культурах *Scutellaria baicalensis* GEORGI

С.А. Саламайкина^{1,2}, А.Ю. Степанова¹, А.И. Соловьева¹

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Одним из растений, способных стать альтернативным источником экологически чистого лекарственного сырья является шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis*). Он синтезирует широкий спектр биологически активных веществ фенольной природы, большинство из которых содержится в подземной части. Основными корнеспецифическими флавонами являются байкалеин, вогонин и их гликозилированные формы – байкалин и вогонозид. Экстракт шлемника байкальского оказывает гипотензивный, противосудорожный, гепатопротекторный, седативный, спазмолитический, антисклеротический, противовоспалительный, десенсибилизирующий, жаропонижающий, антисептический, отхаркивающий, иммуностимулирующий, противоглистный, желчегонный, ноотропный эффект, является сырьем многих биологически активных добавок.

Свет является одним из наиболее значимых для растения физических факторов. Основная роль света – это, безусловно, процесс фотосинтеза. При этом он так же играет ключевую роль в процессе морфогенеза растений, может участвовать в регуляции синтеза вторичных метаболитов, поскольку имеет непосредственную связь с хлорофиллом. В некоторых работах показано, что интенсивность света и его спектральный состав повышает выход биологически активных веществ в лекарственных растениях. В недавно вышедшей работе, проводимой на выращиваемой *in vitro* куль-

туре побегов *Scutellaria lateriflora*, показано увеличение содержания некоторых флавонов при действии на них синего света [1]. Однако в работе использовали побеги, в которых основными метаболитами являются не вышеназванные корнеспецифичные флавоны, а другие метаболиты – скутеллярин, дигидроскутеллярин. Кроме того, в еще одной из недавно вышедших статей, проводимой на ели норвежской показано, что синий свет стимулирует работу фенилпропаноидного пути образования флавоноидов, так как влияет на синтез его ключевых ферментов (фениламмиак лиазы, халконсинтазы) и регулирует около 77% генов флавоноид биосинтеза. Однако полученные результаты, неоднозначны. Некоторыми авторами показано увеличение содержания биологически активных соединений, в том числе и флавоноидов, на синем свете, в других работах к увеличению биомассы и вторичных метаболитов приводила инкубация на красном свете.

Данное исследование было посвящено влиянию спектрального состава света на содержание флавонов в бородачатых корнях (hairy roots) *S. baicalensis* и полученной из них культуре каллусных клеток. Бородачатые корни *S. Baicalensis* – штамм-продуцент флавонов, был получен в 1997 году Кузовкиной И.Н. и Гусевой А.В, из них в 2013 году была инициирована каллусная культура. В рамках эксперимента культуру бородачатых корней культивировали на агаризованной питательной среде Гамборга (B5). Каллусы – на питательной среде того же состава, но с добавлением гормонов - 1 мг/л кинетина и 1 мг/л 2,4-Д. Культивирование проводили при температуре 24°C. В опытах *in vitro* культуры непрерывно в течение месяца освещали синим (420-480 нм), красным (600-650 нм) и теплым белым (400-800 нм) светом, используя светодиоды LED с освещенностью 1 мМ/(м²·с). Контролем служили культуры, выращенные в темноте. В экспериментах производилась оценка ростовых характеристик и содержания основных флавонов (байкалин, байкалеин, вогонин, вогонозид).

Кривые роста бородачатых корней шлемника байкальского, помещенных под светодиоды с разной длиной волны, имели классическую правильную форму с четырьмя фазами роста, которые были разделены по значениям скорости роста от двух до десяти дней. Однако на протяжении четырех недель при разном освещении и изначально у данной культуры были отмечены отличия в приросте биомассы. У бородачатых корней, растущих на белом и синем свете прирост был минимальным. Корневая культура, культивируемая на красном свете, росла значительно лучше остальных и уже на 21 сутки вышла на плато, так же, как и культура, растущая в темноте. В бородачатых корнях, выращиваемых при свете разного спектрального состава доминирующими флавонами были байкалин и его глюкоронид – байкалеин, значительное количество которого было получено на синем и белом свете. В культуре, помещенной на красный цвет и в темноту, значительных отличий в содержании байкалина в корнях и каллусах не было обнаружено.

Показано, что свет также влиял на характеристики роста каллусов *S. baicalensis* – способствовал удлинению стационарной фазы роста по сравнению с контролем, выращенным в темноте. Одновременно на свету было отмечено уменьшение прироста биомассы культуры. Содержание флавонов повышалось в присутствии света, вне зависимости от части спектра. Это происходило, в основном, за счет увеличения образования байкалина. Наибольшее содержание флавонов наблюдали на синем свете (5%). [2] Однако показанной большинством исследователей корреляции между интенсивностью ростовых процессов и образованием флавонов зарегистрировано не было.

Согласно полученным результатам можно сделать вывод, о том, что в бородачатых корнях *S. baicalensis* и в культуре каллусов окислительный стресс может быть вызван одними и теми же факторами.

Литература

1. Jeong-Min Seo, Mariadhas Valan Arasu, Yeon-Bok Kim, Sang Un Park, Sun-Ju Kim. Phenylalanine and LED lights enhance phenolic compound production in Tartary buckwheat sprouts. // Food Chemistry – 2015. Vol. 177 P.204–213.
2. Stepanova AY, Solov'yova AI, Salamaikina SA. Influence of spectral light composition on flavones formation in callus culture of *Scutellaria baicalensis* georgi. // Phcog Mag 2020; 16:156-60

Выбор и получение объектов для разработки методики определения генотоксичности с использованием высокопроизводительного секвенирования**И.М. Михайлов^{1,2}, И.С. Абрамов¹, О.О. Рябая⁴, А.Д. Мацвай^{1,3}, Г.А. Шипулин¹**¹ ФГБУ «Центр стратегического планирования» ФМБА РФ² ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН³ ФГАОУВО «Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»⁴ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Генотоксичность химического соединения может быть связана как со способностью вещества вызывать точечные мутации, так и с возникновением хромосомных aberrаций. В настоящий момент генотоксичность, причиной которой является возникновение единичных мутаций и сдвиг рамки считывания, может быть определена с использованием рутинных методов. Однако не существует метода оценки генотоксичности, опосредованной значительными хромосомными перестройками. В связи с этим представляется интересным создание и валидация методики определения генотоксичности с использованием комплекса тестов, включающих как классические методы оценки, так и методы на основе высокопроизводительного секвенирования, что позволит повысить точность существующих методик анализа. Комплекс мер по созданию методики оценки генотоксичности с использованием секвенирования включает симуляцию условий потребления организмом исследуемых веществ с последующим секвенированием генетического материала, а также оптимизацию существующих методов анализа данных.

В качестве объектов исследования необходимо выбрать соединения, обладающие потенциальной генотоксичностью, а также положительный контроль для валидации разрабатываемой методики. Выбранные вещества – кармуазин, понсо 4R и желтый солнечный закат относятся к классу азосоединений и применяются в пищевой промышленности в качестве красителей. Предполагаемая генотоксичность этих веществ связана с повреждением генетического материала клеток продуктами метаболизма азосоединений. [Khan et al. 2020, Koc and Pandir 2018, Tsuda et al. 2001] Для использования данных красителей в качестве объектов для создания и валидации методики оценки генотоксичности необходимо подтвердить факт генотоксичности классическими методами, а также провести пассирование клеточных линий для получения потенциально мутантного генетического материала. В качестве положительного контроля использовали блеомицин - противоопухолевый антибиотик, для которого показан значительный уровень генотоксичности.

Генотоксичность указанных соединений оценивалась как цитологически, так и с использованием стандартных методов определения мутагенности химических веществ – теста Эймса и теста комет. Цитологические исследования проводились с использованием клеточных линий фибробластов человека hFB-hTERT6. Была показана умеренная цитотоксичность при культивировании указанных клеточных линий с красителями с градиентом концентраций исследуемых веществ в течение 24, 72 и 144 часов. Были проведены пассирования клеточных линий, моделирующие среднюю суточную дозу потребления соответствующих соединений на протяжении 15 и 30 дней для оценки эффекта накопления мутаций при потреблении пищевых добавок в течение длительного периода времени. Для валидации результатов секвенирования в качестве положительного контроля использовали изолят нуклеиновых кислот, полученных при пассировании фибробластов человека hFB-hTERT6 на протяжении 15 и 30 дней с блеомицином. Для всех указанных экспериментов были получены изолированные нуклеиновые кислоты с высокой степенью очистки и низкой степенью фрагментации.

Результаты цитологических исследований позволяют применять полученные изоляты нуклеиновых кислот для разработки методики оценки генотоксичности с использованием высокопроизводительного секвенирования.

Литература

1. Khan I. S. et al. Genotoxic effect of two commonly used food dyes metanil yellow and carmoisine using *Allium cepa* L. as indicator //Toxicology reports. – 2020. – Т. 7. – С. 370-375.
2. Koç K., Pandir D. All aspect of toxic effect of brilliant blue and sunset yellow in *Allium cepa* roots //Cytotechnology. – 2018. – Т. 70. – №. 1. – С. 449-463.

3. Tsuda S. et al. DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice //Toxicological Sciences. – 2001. – Т. 61. – №. 1. – С. 92-99.

УДК 614.44

Выявление возбудителей острых кишечных инфекций человека методом высокопроизводительного секвенирования

А.В. Сай¹, А.Д. Мацвай^{1,2}, К.Ф. Хафизов^{1,2}, Г.А. Шипулин¹

¹ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью»

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Согласно данным ВОЗ, ежегодно умирает 1,8 миллиона человек от острых кишечных инфекций (ОКИ), среди них большую часть составляют дети в возрасте до пяти лет, и даже в развитых странах для них ОКИ – одна из пяти причин болезней и смерти. [1] Основной путь заражения ОКИ – употребление некачественной воды, которая обсеменена патогенными микроорганизмами, и постоянный мониторинг позволяет своевременно локализовать источник и предотвратить развитие распространение инфекций. На сегодняшний день для мониторинга качества воды используется несколько подходов – применение культуральных методов, что трудоемко, длительно по времени и не всегда позволяет обнаружить всех патогенов; полимеразная цепная реакция (ПЦР) – является целевым подходом, который выявляет только гены ограниченного спектра возбудителей и не предоставляет возможность обнаружения новых. [2] Таким образом, рутинно используемые в настоящее время подходы к мониторингу качества воды, в основном основанные на определении фекальных индикаторных бактерий, недостаточно отражают воздействие на здоровье человека патогенных организмов, присутствующих в природных водных источниках, а также системах центрального водоснабжения. Появление «эры микробиома» и технологий высокопроизводительного метагеномного секвенирования предоставляет возможность для серьезного улучшения инструментов оценки качества воды. В рамках данной работы была разработана система, позволяющая с использованием методов NGS проводить комплексный анализ биоразнообразия микроорганизмов бактериальной, грибковой, эукариотической и вирусной природы в рамках единого исследования. С помощью разработанной системы было проведено исследование водопроводных, сточных и поверхностных вод, и показана эффективность применения метода NGS для рассматриваемой задачи.

В данном исследовании обнаружение бактерий, вирусов и грибов осуществлялось при помощи метабаркодирования нуклеиновых кислот – таксономической идентификации видов, путем амплификации высоко вариабельных участков для каждого вида с праймеров к консервативным областям (16S, 18S, ITS и консервативные участки 11 видов вирусов, являющихся патогенными для человека) и секвенирования на высокопроизводительной платформе (Illumina).

Нами были исследованы три типа вод, которые были отобраны в г. Москве: поверхностная (18 образцов), водопроводная (9 образцов) и сточная (24 образца). Была обнаружена зависимость между категорией источника воды и ее обсемененностью. На основании исследования нуклеиновых кислот было обнаружено, что во всех типах вод основное биологическое разнообразие формируют бактерии, в сточной и водопроводной воде грибы преобладают над эукариотами. Нами были обнаружены следующие возбудители заболеваний человека: *Arcobacter* – в 20 образцах сточной воды, в 5 поверхностной воды (*Arcobacter* являются возбудителями диареи, вызывают бактериемию, эндокардит, перитонит, гастроэнтерит и диарею у людей [3]); *Acinetobacter* – в 7 образцах водопроводной воды, в 21 образцах сточной воды, в 8 образцах поверхностной воды (представители *Acinetobacter* обладают резистентностью к существующим антибактериальным препаратам, поэтому в феврале 2017 года ВОЗ причислила ацинетобактерии к наиболее опасным бактериям); *Aeromonas* – в 8 образцах водопроводной воды, в 10 образцах сточной воды (два основных заболевания, связанных с *Aeromonas* – это гастроэнтерит и раневые инфекции с бактериемией или без); *Bacillus* – в 7 образцах водопроводной воды, в 1 образце сточной воды, в 3 поверхностной воды (некоторые бациллы вызывают болезни животных и человека, например, токсикоинфекции); *Corynebacterium* – в 1 образце сточной воды; – в 7 образцах водопроводной воды, в 1 образце сточной воды, в 3 поверхностной воды (патогенные штаммы *Corynebacterium* способны поражать кожу и внутренние органы, у пациентов с иммуносупрессией, вызывая эндокардиты, пневмонии, септический артрит и остеомиелит, заболеваний мочеполовой системы.); *Enterococcus* – в 2 образцах водопроводной воды (*Enterococcus* является возбудителем внутрибольничных инфекций);

Pseudomonas – в 2 образцах водопроводной воды, в 11 образцах сточной воды, в 8 поверхностной воды (представители рода являются одними из наиболее распространённых госпитальных патогенов во всем мире); *Streptococcus* – в 14 образцах сточной воды, в 3 поверхностной воды (представители рода являются возбудителями инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей); *Staphylococcus* – в 1 образце сточной воды (условно-патогенный организм, зачастую возбудитель нозокомиальных инфекций); *Klebsiella* в 1 образце сточной воды (некоторые штаммы *Klebsiella* условно-патогенные микроорганизмы, заражая тяжелобольных и больных с ослабленным иммунитетом, являются распространенной причиной инфекций, включая пневмонию, инфекции мочевыводящих путей и инфекции кровотока); *Leptospira* – в 14 образцах сточной воды, в 5 поверхностной воды (вызывает инфекционное поражение печени); *Legionella* – в 12 образцах сточной воды, в 4 образцах поверхностной воды (*Legionella* – вызывает инфекционное заболевание верхних дыхательных путей, расстройство желудочно-кишечного тракта и нервной системы); *Acanthamoeba* – в 1 образце сточной воды (*Acanthamoeba* является одноклеточным паразитом, поражающим роговицу глаза); *Balantidium* – в 3 образцах сточной воды (*Balantidium* – паразитической инфузорией и является возбудитель балантидиоза); *Blastocystis hominis* – 4 образцах сточной воды, в 1 образце поверхностной воды (*Blastocystis hominis* – простейший одноклеточный паразит, поражение которым вызывает бластоцитоз).

Среди исследуемых таксономических групп вирусов (*Mastadenovirus*, *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Astroviridae*, *Norovirus GI/II*, *Orthocoronavirinae*, *Orthohepevirus A*, *Hepatovirus*, *Rotavirus A*, *Enterovirus*, *Avihepadnavirus*) был обнаружен *Rotavirus A* в 3 образцах сточной воды и в 2 образцах поверхностной; представитель семейства *Astroviridae* был обнаружен в одном образце сточной воды. Эти вирусы провоцируют расстройство желудочно-кишечного тракта, основными симптомами которого являются диарея, тошнота, рвота, недомогание и боли в животе.

Постоянный мониторинг качества воды с применением методов метабаркодинга позволяет обнаружить широкий спектр патогенных организмов в рамках одного исследования, что может быть использовано для эпидемиологического контроля и предотвращения возможных вспышек инфекционных заболеваний.

Литература

1. Wierzbica T. F. Implications and measurement of herd protection (indirect effects) for enteric vaccine development // *Vaccine*. – 2019. – Т. 37. – №. 34. – С. 4775-4777.
2. Hong P. Y., Mantilla-Calderon D., Wang C. Mini Review: Metagenomics as a tool to monitor reclaimed water quality // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2020.
3. Ramees T. P. et al. Arcobacter: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control—a comprehensive review // *Veterinary Quarterly*. – 2017. – Т. 37. – №. 1. – С. 136-161.

УДК 617.713

Выявление новых генетических локусов, ассоциированных с эндотелиальной дистрофией роговицы Фукса

Л.Н. Юльметова^{1,2}, Е.И. Шарова², Л.О. Скородумова²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России

Первичная эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса (ДФ) — это заболевание глаз, связанное со снижением плотности и функций клеток эндотелия роговицы. Уменьшение числа клеток эндотелия, ответственного за поддержание водного баланса, приводит к отеку роговицы и, следовательно, к снижению остроты зрения. Поздняя форма ДФ диагностируется у 5% населения старше 50-ти лет.

Благодаря ранним исследованиям [1-3] известно, что единственным подтвержденным генетическим маркером ДФ является экспансия повторов CTG18.1 в гене TCF4. Однако данная причина объясняет только 70% случаев заболевания в популяциях европейского происхождения. Цель нашего исследования заключалась в поиске и последующем изучении новых локусов, ассоциированных с ДФ. Поскольку мы располагали данными генотипирования для большой внешней выборки

людей (2.5 тыс. человек) с известными офтальмологическими диагнозами, это позволило нам реализовать два крупных биоинформатических подхода к изучению заболевания: полногеномное исследование ассоциаций (GWAS) и анализ вариаций числа копий в ДНК (CNVs).

Первичный GWAS подтвердил сильный сигнал в области упомянутого ранее гена TCF4 из 18 хромосомы (рис. 1а). Учитывая предположение, что ДФ - заболевание с большим количеством фенокопий, помимо TCF4 мы ожидали увидеть группу сигналов из других регионов, демонстрирующих в сравнении с ним гораздо более слабые показатели значимости. Чтобы усилить сигнал от других локусов и детектировать их, нами была предпринята попытка провести GWAS-сравнение на отдельной подгруппе пациентов, развитие ДФ у которых не было связано с экспансией повторов CTG18.1 (рис. 1б). Опираясь только на однонуклеотидные варианты, достоверно установить число повторов невозможно. При помощи метода главных компонент (PCA) и значений отношения шансов (odds ratio), мы определили высокорисковый минорный гаплотип, предположительно ассоциированный с повышенным количеством повторов. Затем мы исключили из анализа людей, обладающих данным гаплотипом, что повысило значимость тех вариантов, значения аллелей которых представлены в подгруппе пациентов, не имеющих экспансии повторов CTG18.1 (подгруппа без-маркерных пациентов).

Таким образом, мы выявили 5 кандидатных локусов (с порогом p-value в 5×10^{-7}), которые впоследствии собираемся проверить методом аллель-специфической ПЦР, проведенной на нашей выборке, содержащей 200 больных ДФ.

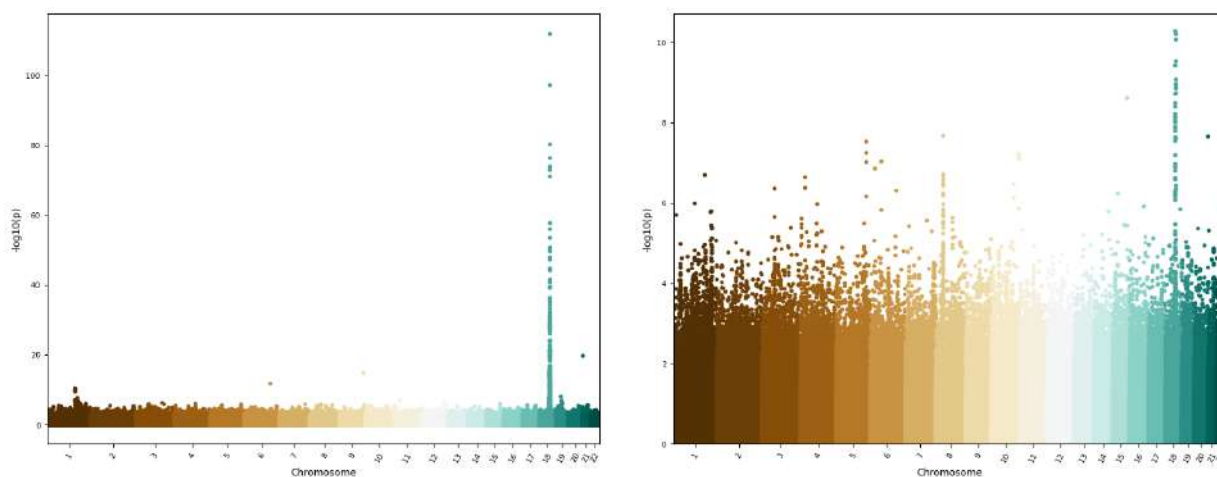


Рис. 1. Ассоциации между 2097194 полиморфными вариантами и дистрофией роговицы Фукса, рассчитанные на всей выборке людей (а) и на выборке контролей и пациентов с гаплотипами, с высокой долей вероятности исключающими экспансию повторов CTG18.1 (б).

Вторая часть исследования была посвящена изучению вариантов измененной копийности сегментов генома (CNV), вычисленных по имеющимся чиповым данным. Среди всей выборки пациентов мы идентифицировали 30 тысяч CNV-регионов, прошедших контроль качества данных. Сравнивая их с CNV, определенными на группе здоровых людей, мы отобрали 17 участков, статистически обогащенных в выборке больных ДФ. Двое из них представляют особый интерес: это делеция вблизи старта гена ITGA11 и амплификация экзона с фрагментами интронов в гене COL26A1. Стоит заметить, что и COL26A1, и ITGA11 экспрессированы в эндотелии, причем ITGA11 экспрессирован только в образцах пациентов с ДФ без экспансии повторов CTG18.1. Коллаген 26 - белок внеклеточного матрикса, изменения в состоянии которого являются одним из ведущих механизмов патогенеза при ДФ. Интегрин 11 обеспечивает прикрепление миофиibroбластов к внеклеточному матриксу и также играет существенную роль в развитии фиброза. Интересно, что в область CNV в районе гена ITGA11 попадает сайт связывания нескольких транскрипционных факторов, часть из которых на высоком уровне экспрессируется в эндотелии. То есть, обнаруженная делеция может нарушать регуляцию, реализуемую данным сайтом связывания в эндотелии.

Литература

1. Wieben E.D., Aleff R.A., Tosakulwong N., Butz M.L., Highsmith W.E., Edwards A.O., Baratz K.H. A common trinucleotide repeat expansion within the transcription factor 4 (TCF4, E2-2) gene predicts Fuchs corneal dystrophy. *PLOS One*. 2012; 7(11): e49083
2. Baratz K.H., [et al.]. E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy. *N Engl J Med*. 2010; 363(11):1016-1024.
3. Afshari N.A., [et al.]. Genome-wide association study identifies three novel loci in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Nature Communications*. 2017; 8:14898.
4. Skorodumova L.O., Belodedova A.V., Antonova O.P., Sharova E.I., Akopian T.A., Selezneva O.V., Kostryukova E.S., Malyugin B.E. CTG18.1 Expansion is the Best Classifier of Late-Onset Fuchs' Corneal Dystrophy Among 10 Biomarkers in a Cohort From the European Part of Russia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018; 59(11):4748-4754.
5. Glessner J.T., [et al.]. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature*. 2009; 459(7246):569-573

УДК 617.713

Идентификация молекулярной эволюции человека с помощью генных сетей

А.Н. Ваулин¹, А.С. Касьянов^{1,2}, И. Ю. Морозова³

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт общей генетики РАН

³The Institute of Evolutionary Medicine, University of Zurich

Для детекции естественного отбора на геномном уровне применяются различные метрики, учитывающие частоты находящихся в генах однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Однако, если признак полигенный, то метрики будут давать небольшие значения, и обнаружение отбора будет затруднено, поскольку значение его метрики будет разделено между всеми этими генами. Большинство существующих исследований анализируют метрики отбора отдельных SNP, что позволяет изучать отбор на уровне индивидуальных генов. В случае, когда признак полигенный, он обусловлен взаимодействием разных генов, и анализ отбора должен принимать во внимание эти взаимодействия. . Нами был разработан алгоритм обнаружения признаков отбора при полигенном наследовании, работающий на уровне генных сетей.

Была написана программа на языке Python, которая принимает на вход значения отбора (метрики) по однонуклеотидным полиморфизмам (SNP) и определяет генные сети, по которым идет отбор в популяции. SNP предварительно были сопоставлены с соответствующими генами с помощью программы SnpEff. Были использованы 303 генные сети KEGG. За метрику генной сети принималась медиана метрик SNP в ней. Для определения p-value случайным образом генерировались сети с таким же числом однонуклеотидных полиморфизмов, как в данной генной сети, и вычислялись метрики этих сетей. Эта процедура повторялась 40000 раз, и за p-value принималась доля случаев, когда метрика случайной сети больше либо равна метрике рассматриваемой сети (пермутационный метод). Далее для p-value использовалась поправка Бонферрони. Исследование проводилось для популяции американцев европейского происхождения, которая сравнивалась с совокупностью европейских популяций. Были взяты данные проекта 1000 Genomes.

В результате были получены генные сети, между которыми выявлены значимые различия для американской и европейской выборок. Эти сети связаны в основном с функционированием иммунной системы, включая аутоиммунные заболевания и реакцию на различные патогены.

Таким образом, создан метод, на базе которого реализована программа, выявляющая отбор по полигенным признакам на основе частот SNP в популяции, и выявлены биохимические процессы, испытывающие разное давление отбора в европейской популяции и у американцев европейского происхождения.

Литература

1. Bhatia, G., et al. 2011. Genome-Wide Comparison of African-Ancestry Populations from CARE and Other Cohorts Reveals Signals of Natural Selection. *American Journal of Human Genetics* 89 (3): 368–81.

Изменение врожденного иммунитета астроцитов в ответ на метаболические адаптации

А.А. Родионова-Кравченко¹, Д.В. Чистяков², С.В. Горяинов³, М.Г. Сергеева²

¹МГУ имени М.В. Ломоносова

²НИИ Физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

³Российский университет дружбы народов

Многие заболевания центральной нервной системы сопровождаются хроническими воспалительными процессами, активную роль в регуляции которых выполняют глиальные клетки мозга. Наряду с микроглией, астроциты являются активными участниками системы врожденного иммунитета центральной нервной системы, они способны экспрессировать и распознавать широкий спектр различных цитокинов: фактор некроза опухоли-альфа (TNF α), IL-6 (интерлейкин-6), IL-10, IL-1 α и др., а также различные молекулярные паттерны, способные активировать систему Toll-подобных рецепторов (TLR) [1].

Важную роль в воспалительном ответе астроцитов играют полиненасыщенные жирные кислоты, (такие как арахидоновая кислота, докозагексаеновая кислота и эйкозапентаеновая кислота), а также их производные, оксипирины, образующиеся через циклооксигеназный, липоксигеназный и эпоксигеназный путь метаболизма [2]. Показано, что изменение метаболизма оксипиринов связано с различными заболеваниями, в том числе связанными с изменением энергетических процессов в организме, таких как ожирение, диабет, метаболический синдром. Было показано, что адаптация астроцитов к различной концентрации глюкозы в среде влияет на воспалительный ответ [3]. Однако влияние адаптации астроцитов к повышенной концентрации глюкозы на синтез оксипиринов в клетках ЦНС не изучено.

Целью нашей работы являлось сравнение клеточного ответа астроцитов, адаптированных к различной концентрации глюкозы при стимуляции клеток липополисахаридом (агонист TLR4) и IL-1 α (агонист рецептора IL-1).

Исследование проводилось на культурах эукариотических клеток: первичных астроцитах крыс, которые стимулировались на 10-14 день культивирования после выделения из головного мозга новорожденных животных. В работе использовалась модель длительной (10-14 дней) и кратковременной (48 ч) адаптации астроцитов к среде с нормальной (5,5 мМ) и с повышенной (25 мМ) концентрацией глюкозы. Затем клетки стимулировались липополисахаридом (100 нг/мл) или IL-1 α (5 нг/мл).

Профиль оксипиринов во внеклеточной среде определялся методом ВЭЖХ-МС/МС с помощью тройного квадрупольного масс-спектрометра Shimadzu 8040. Липидные компоненты выделялись методом твердофазной экстракции с использованием колонок Oasis HBL. Соединения были идентифицированы и количественно определены путем сравнения их масс-спектрометрических и хроматографических данных с данными, полученными для соответствующих стандартов оксипиринов с использованием программного обеспечения Lipid Mediator Version 2 (Shimadzu, Япония).

В клеточном супернатанте было идентифицировано 39 соединений, производных арахидоновой, докозагексаеновой, эйкозапентаеновой и линолевой кислот. Результаты эксперимента показывают, что при стимуляции клеток IL-1 α при длительной адаптации астроцитов к повышенной концентрации глюкозы приводит к усилению синтеза простагландинов 6-keto-PGF1 α и PGE2, и снижению синтеза тромбксана B2 (TXB2). Повышенная концентрация глюкозы при стимуляции клеток липополисахаридом усиливает синтез метаболитов арахидоновой кислоты, в первую очередь, простагландинов PGE2 и PGD2.

Полученные данные свидетельствуют о выраженном изменении синтеза оксипиринов при клеточной адаптации астроцитов к различной концентрации глюкозы в среде. Детальные молекулярные механизмы наблюдаемых эффектов требуют дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-00068). Масс-спектрометрический анализ выполнен при поддержке программы РУДН "5-100".

Литература

1. *Safroniew MV*. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. Trends Immunol. 2020 Sep;41(9):758-770
2. *Chistyakov DV, Astakhova AA, Azbukina NV, Goriainov SV, Chistyakov VV, Sergeeva MG*. Cellular Model of

- Endotoxin Tolerance in Astrocytes: Role of Interleukin 10 and Oxylipins. Cells. 2019 Dec 1;8(12):1553.
3. Chistyakov DV, Azbukina NV, Astakhova AA, Polozhintsev AI, Sergeeva MG, Reiser G. Toll-like receptors control p38 and JNK MAPK signaling pathways in rat astrocytes differently, when cultured in normal or high glucose concentrations. Neurochem Int. 2019 Dec; 131:104513.

УДК 577.2:616-006

Изучение вклада фосфолипазы PLA2G16 в эффективность репликации непатогенных онколитических энтеровирусов

О. Н. Алексеева^{1,2}, М. А. Вольская², А. В. Липатова²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН

Применение непатогенных штаммов онколитических энтеровирусов в терапии различных злокачественных новообразований является новым перспективным подходом [1-4]. Однако даже в пределах одной нозологической группы опухолевые клетки существенно различаются, что сказывается на эффективности применения вирусной терапии. Поиск и валидация молекулярно-генетических детерминант чувствительности злокачественных клеток к непатогенным вирусам является актуальной задачей. Одним из важных белков, участвующих в эндоцитозе, является белковый продукт гена PLA2G16 (фосфолипаза А и ацилтрансфераза 3, PLAAT3), описанная в литературе [5-6], как наиболее существенный биомаркер, определяющий способность энтеровирусных частиц эффективно проникать и процессироваться в опухолевой клетке. С целью верификации были проанализированы данные транскриптомного секвенирования широкого ряда модельных клеточных линий (рис. 1) и выбраны 2 линии: с высоким уровнем экспрессии (НЕК293Т – трансформированная SV40-антигеном эмбриональная почка) и низким уровнем экспрессии (А431 – эпидермальная карцинома человека).

Репликативная эффективность 4 непатогенных штаммов онколитических энтеровирусов (Живая энтеровирусная вакцина (ЖЭВ14 – Коксаки В5, ЖЭВ8 – Коксаки А7, ЖЭВ4 – Эховирус 12 и вакцинный штамм полиовируса 1 типа (Сэбин)) оценивалась в данных культурах НЕК293Т и А549. Результаты приведены на диаграмме (рис.2).

Для верификации взаимосвязи планируется получение сублиний с подтвержденной экзогенной экспрессией PLA2AG16 и оценка в них онколитической активности непатогенных энтеровирусных штаммов. С этой целью была получена плазмидная конструкция, содержащая фосфолипазу PLA2G16 (рис. 3), слитую с синим флуоресцентным белком (BFP) под управлением цитомегаловирусного промотора, с использованием которой планируется получение соответствующих лентивирусных стоков для проведения дальнейшей трансдукции.

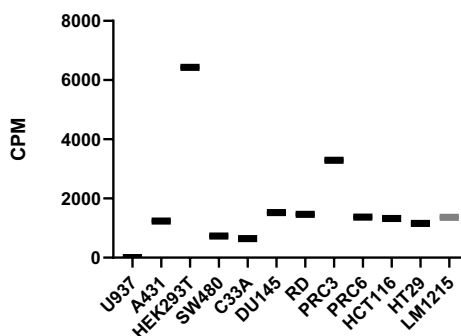


Рис. 1. Уровни экспрессии фосфолипазы PLA2G16 в различных опухолевых клеточных линиях.

Изучение пролиферативной активности фибробластов на полимерных матриксах из биоразлагаемых полимеров

*А.Ю. Полянская¹, Е.Р. Павлова^{1,2}, В.В. Бояринцев¹, А.В. Трофименко¹, Г.И. Фильков¹,
Д.В. Багров^{2,3}, Д.В. Клинов^{1,2}, М.О. Дурыманов¹*

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²НИИ физико-химической медицины ФМБА

³Московский государственный университет им.М.В.Ломоносова

Поиск биосовместимых материалов и изучение их свойств является актуальной задачей для регенеративной медицины. Основные разработки в сфере тканевой инженерии направлены на создание эффективных и биосовместимых матриц для регенерации тканей. В настоящее время активно разрабатываются матрицы со специфическими функциями - уменьшающие рубцевание или риск возникновения инфекций [1].

В настоящей работе были получены полимерные матрицы из полилактида (PLA), полидиоксана (PDX), и полилактида с желатином (9:1 по массе). Полилактид широко используется в тканевой инженерии благодаря биосовместимости и способностям к биодеградации и остеоинтеграции [2]. Полидиоксан используется в качестве биоразлагаемого шовного материала [4]. Используемые в работе матрицы были получены с применением технологии электроспиннинга, в основе которой лежит процесс электрогидродинамического распыления жидкостей [3]. Пористая структура матрикса, полученного по технологии электроспиннинга, не препятствует движению в нем клеток и транспортировке питательных веществ и кислорода для клеточного роста [1].

Для тестирования цитосовместимости материалов на основе PLA, PLA:желатин и PDX использовали клеточную культуру фибробластов NIH 3T3. Оценка пролиферативной активности клеток проводилась методом проточной цитометрии путём окраски снятых с матриц клеток ДНК-связывающим флуоресцентным красителем пропидий йодидом, что позволило выявить клетки в G1/G0, S и G2/M фазах клеточного цикла. В результате работы для всех исследуемых матриц были получены ДНК-профили, согласно которым доля пролиферирующих клеток (находящихся в S и G2/M фазах) составила около 30 %, что говорит о высокой степени цитосовместимости полученных матриц.

Литература

1. Bhowmick S., Scharnweber D., Koul V. Co-cultivation of keratinocyte-human mesenchymal stem cell (hMSC) on sericin loaded electrospun nanofibrous composite scaffold (cationic gelatin/hyaluronan/chondroitin sulfate) stimulates epithelial differentiation in hMSCs: In vitro study. //Biomaterials. 2016. V. 88. P. 83-96
2. Dedukh N.V., Makarov V.B., Pavlov A.D. Polylactide-based biomaterial and its use as bone implants (analytical literature review). // Pain, joints, spine. 2019. V. 9(1), P. 28-35
3. Travis J. Sill, Horst A. von Recum Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. // Biomaterials. 2008. V. 29. P. 1989-2006
4. Лусин А. В., Ахмедова А. И., Федорчук А.Н., Спиридонова Р. Р. Перспективный шовный материал - полидиоксанон. // Химические науки. 2015. Т. 6(15) с. 19-21

Инфекционные процессы бактериофага ф24В

А.С. Кузнецов¹, А.Д. Ефимов², А.К. Голомидова², А.В. Летаров^{1,2}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

²Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН

Бактериофаги, или фаги, — группа вирусов, которые могут инфицировать бактериальные клетки и реализовывать два основных варианта жизненного цикла: литический (продуктивная инфекция, приводящая к образованию новых вирусных частиц и лизису клетки) и лизогенный. Последний свойственен умеренным бактериофагам, которые способны сохранять свой геном в виде профага, встроенного в геном бактериальной клетки. В определенных условиях может происходить

индукция профага и переключение инфекционного цикла вируса с лизогенного на литический вариант. Наличие профага часто ведет к лизогенной конверсии, в результате которой клетка-хозяин может приобретать новые фенотипические свойства. Фаг $\phi 24B$ - распространённый *Stx*-конвертирующий бактериофаг шига-токсигенных *Escherichia coli* (STEC). В геноме этого подовируса имеется ген шигаподобного токсина *stx*, который экспрессируется при индукции профага в лизогенных клетках *E. coli*, при этом токсин высвобождается при лизисе клетки одновременно с фаговым потомством [1]. Некоторые штаммы STEC являются очень опасными возбудителями пищевых инфекций у животных, что может вести к вынужденному забою скота, кишечник которого колонизирован этими патогенами, и существенным экономическим потерям в сельском хозяйстве [2]. Также вместе с конверсией к токсигенности профаг $\phi 24B$ заметно изменяет метаболическую активность клетки [3], усиливая патогенный потенциал лизогена.

Ключевым событием для лизогенизации оказывается адсорбция вирусной частицы на поверхности клетки-хозяина. Известно, что конечным рецептором фага является бактериальный белок *BamA* [4], однако детали адсорбции остаются неизвестными, и в частности то, какую роль в этом процессе играет наличие О-антигена в составе липополисахаридов на поверхности инфицируемых клеток.

В ходе данной работы нами была исследована адсорбция лабораторного штамма фага $\phi 24B:\Delta stx$ на поверхности клеток *E. coli* MG1655 (рис.1). Для этого смесь фага и бактерий инкубировали в среде LB с добавлением 10mM $CaCl_2$ и 10mM $MgSO_4$ при комнатной температуре, отбирая по истечении определенного времени образцы и осаждая клетки, после чего титровали супернатант методом двуслойного агара и подсчета негативных колоний.

Для получения лизогенов по $\phi 24B:\Delta stx$ культуры бактерий смешивали с вирусом таким образом, чтобы множественность инфекции была равна 5, после чего инкубировали смесь в присутствии 10mM $CaCl_2$ и 10mM $MgSO_4$ при 37°C и качании на протяжении 3 часов. Ген *stx* штамма $\phi 24B:\Delta stx$ инактивирован вставкой гена хлорамфениколацетилтрансферазы *cat*, поэтому селекцию полученных лизогенов проводили на твердой среде, содержащей хлорамфеникол. Полученные результаты (табл.1) показали, что эффективность лизогенизации в случае штаммов с нарушенным синтезом О-антигена в составе ЛПС значительно превышает таковую в случае штаммов с нормальным О-антигеном. Большинство полученных из О-антиген-положительных штаммов лизогенов оказалось мутантами, неспособными к синтезу полноценного О-антигена (т. н. rough-мутанты).

Сравнительно длительный период адсорбции может говорить о сложном механизме взаимодействия рецептор-распознающих белков данного бактериофага и молекул на поверхности бактериальной клетки. При этом О-антиген на поверхности клетки играет определяющую роль в процессе адсорбции, по всей видимости, обеспечивая пространственное экранирование конечного рецептора фага — белка *BamA*. Эта роль О-антигена в определении адсорбционной устойчивости бактерий имеет большое экологическое значение для *stx*-конвертирующих бактериофагов, родственных $\phi 24B:\Delta stx$.

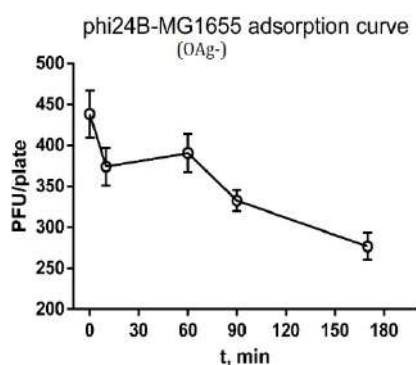


Рис.1. Кривая адсорбции фага $\phi 24B$ на поверхности клеток штамма MG1655, по оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — число БОЕ на чашке

Используемый штамм <i>E. coli</i>	Титр клеток после инкубации без фага, на обычной среде, КОЕ/мл	Титр клеток после инкубации с фагом, селекция на среде с хлорамфениколом, КОЕ/мл	Эффективность лизогенизации на клетку (доля лизогенов от всех клеток)
4s (OAg ⁺)	$\sim 8 \times 10^8$	327	$\sim 4 \times 10^{-7}$
4sR (OAg ⁻)	$\sim 2 \times 10^8$	$\sim 5,7 \times 10^3$	$\sim 2,85 \times 10^{-5}$
f17 (OAg ⁺)	$\sim 2 \times 10^8$	287	$\sim 1,4 \times 10^{-7}$
f17 Δ wbbL #1 (OAg ⁻)	$\sim 8 \times 10^8$	$\sim 8,3 \times 10^3$	$\sim 1 \times 10^{-5}$

Табл.1. Результаты лизогенизации по ф24B Δ stx с использованием штаммов клеток с О-антигеном (4s, f17) и без О-антигена (4sR, делеционный мутант штамма f17)

Литература

1. Sváb D. *et al.* A novel transducible chimeric phage from Escherichia coli O157: H7 Sakai strain encoding Stx1 production //Infection, Genetics and Evolution. – 2015. – Т. 29. – С. 42-47.
2. Geue L. *et al.* Evidence for contemporary switching of the O-antigen gene cluster between shiga toxin-producing escherichia coli strains colonizing cattle //Frontiers in microbiology. – 2017. – Т. 8. – С. 424.
3. Holt G.S. *et al.* Shigatoxin encoding Bacteriophage ϕ 24 B modulates bacterial metabolism to raise antimicrobial tolerance //Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-14.
4. Smith D.L. *et al.* Short-tailed stx phages exploit the conserved YaeT protein to disseminate Shiga toxin genes among enterobacteria //Journal of bacteriology. – 2007. – Т. 189. – №. 20. – С. 7223-7233.

УДК 577.2

Исследование роли нерецепторных киназ семейства Src в прогрессии злокачественных заболеваний

А.М. Михеева¹, Т.Д. Лебедев², В.С. Прасолов^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Лаборатория клеточных основ развития злокачественных заболеваний

Киназы семейства SRC – это ферменты, которые участвуют в регуляции многих процессов в клетке, таких как деление, выживание, рост, дифференцировка, подвижность и др. Экспериментально было доказано, что в злокачественных клетках экспрессия SRC киназ выше, чем в обычных, но их роль в прогрессии рака остается неизвестной [1]. SRC киназы могут выступать в качестве мишени для противораковых препаратов, и несколько ингибиторов SRC уже проходят клинические испытания для лечения различных онкологических заболеваний [2].

По разным источникам семейство SRC включает в себя от 5 до 11 белков (Src, Fyn, Lyn, Yes, Blk, Yrk, Frk, Fgr, Hck, Lck и Srm), активность которых различна в клетках разных типов [3]. Но вклад отдельных SRC киназ при разных типах онкологических заболеваний остается неизвестным. В нашей работе мы изучали связь экспрессии различных SRC киназ с чувствительностью клеток к противораковым препаратам.

В ходе данной работы мы определили уровень экспрессии ряда SRC киназ (Src, Fyn, Lyn, Yes, Fgr, Hck) в клетках немелкоклеточного рака легких (H1299, A549), колоректального рака (HCT-116, HT-29, SW-480) и рака молочной железы (SK-BR-3, MCF-7). Определили чувствительность клеток этих линий к ингибиторам SRC киназ (Bosutinib и Dasatinib). Также изучили совместное действие ингибиторов SRC с другими противораковыми препаратами (Gefitinib, Axitinib, Doxorubicin и 5-fluorouracil).

Нами были выявлены киназы семейства SRC, экспрессия которых характерна для определенных типов злокачественных клеток. Уровни экспрессии SRC киназ были сопоставлены с чувствительностью злокачественных клеток к действию ингибиторов SRC киназ и других противораковых препаратов. Эти данные помогут сделать вывод о связи между экспрессией SRC киназы и ответом клеток на действие ингибиторов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-70119.

Литература

1. *Wheeler D.L., Iida M., Dunn E.F.* The role of Src in solid tumors //The oncologist. – 2009. – Т. 14. – №. 7. – С. 667.
2. *Lieu C., Kopetz S.* The SRC family of protein tyrosine kinases: a new and promising target for colorectal cancer therapy //Clinical colorectal cancer. – 2010. – Т. 9. – №. 2. – С. 89-94.
3. *Marhäll A., Kazi J.U., Rönstrand L.* The Src family kinase LCK cooperates with oncogenic FLT3/ITD in cellular transformation //Scientific Reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-8.

УДК 578.1

Метаболические изменения в гепатоцитах при инфекции вирусом гепатита С: исследование в физиологической среде

М.В. Голиков^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

В настоящее время вирус гепатита С (ВГС) является одной из наиболее серьезных проблем в области здравоохранения человека [1]. По данным ВОЗ во всем мире им поражено около 71 миллиона человек. У носителей вируса могут возникать разнообразные патологии печени, например: фиброз, цирроз, стеатоз, гепатоцеллюлярная карцинома и т.д. Кроме того, известно, что ВГС может вызывать целый ряд внепеченочных патологий [2]. Возникающие патологии зачастую могут приводить к летальному исходу: ежегодно около 400 тысяч человек становятся жертвами ассоциированных с ВГС патологий. Несмотря на определенные успехи, достигнутые в диагностировании, лечении и профилактике вируса гепатита С случаи заражения все еще происходят в некоторых регионах мира [3]. Кроме того, эффективность той или иной терапии сильно зависит от генотипа/субтипа вируса и даже единичных специфических мутаций, а перспективные прототипы вакцин столкнулись с пока непреодолимыми проблемами, связанными с высокой генетической вариабельностью отдельных участков генома вируса.

Хорошо известным является тот факт, что эффективность репликации вируса находится в зависимости от степени метаболических изменений, которые вирус вызывает в пораженной клетке. Также известно, что метаболизм клетки достаточно сильно зависит от условий культивирования (в том числе от ростовой среды). Исследования метаболизма гепатоцитов при их инфицировании ВГС могут иметь значительно искаженные результаты из-за слишком сильного влияния нефизиологических (стандартных) культуральных сред (напр. MEM, DMEM, F12, F10, DMEM/F12, RPMI), которые создавались для длительного поддержания клеточных культур и не отражают реальные физиологические условия. В последние годы были предложены физиологически обоснованные среды (напр. Plasmix, HPLM) и было показано, что метаболические изменения в таких условиях часто имеют принципиально иной характер [4].

Целью данной работы было исследование метаболических изменений гепатоцитов в физиологических и стандартных средах при их инфекции вирусом гепатита С. Объектом исследования была линия клеток Huh7.5 перmissive к ВГС, а также система репликона (JFH1). Экспрессия генов оценивалась методом ОТ-ПЦР в реальном времени, а цитотоксичность веществ - МТТ-тестом. Показатели митохондриального дыхания и гликолиза измерялись с помощью технологии Seahorse.

На основе анализа экспрессии более 70 генов были выявлены изменения в таких метаболических путях, как глутаминолиз, пентозофосфатный путь, биосинтез серина и некоторых других. Раковые клетки, являющиеся основной моделью всевозможных экспериментов, часто выражают зависимость от анаплеоротических реакций цикла мочевины, например, от метаболического пути глутаминолиза. По-видимому, эта зависимость во многом вызвана искусственно созданными условиями культивирования, уровень экспрессии глутаминазы (GLS) - ключевого фермента этого метаболического пути был ниже для клеток, культивируемых в физиологической среде Plasmix. Другим метаболическим отличием раковых клеток является эффект Варбурга - усиление гликолиза путем шунтирования пирувата в лактат лактатдегидрогеназой (LDH). При культивировании клеток в среде Plasmix уровень экспрессии LDH был снижен по сравнению с его уровнем в DMEM. Также при переходе к физиологической среде была выявлена активация пути биосинтеза серина и глицина, что согласуется с более низкими уровнями экспрессии PKM2, кроме того, снизился уровень транскрипции G6PD – ключевого фермента пентозофосфатного пути.

Кроме того, была дана оценка цитотоксичности некоторых ингибиторов (рис. 1). Так, например, клетки, культивируемые в среде Plasmach, становятся менее чувствительными к ингибированию лактатдегидрогеназы (LDHA), но более чувствительными к ингибитору гексокиназы (HK2). На основе анализа экспрессии были выявлены изменения в динамике репликации вируса в клетках, культивируемых в физиологической среде.

Изменения были выявлены и в уровнях клеточного дыхания (рис. 2). Клетки, культивируемые в среде Plasmach, показали более высокий уровень базального дыхания, а также максимального дыхания и, соответственно, большую запасную дыхательную емкость, но не было обнаружено значимой разницы в уровне продукции АТФ. При этом не было также выявлено существенной разницы и в основных параметрах гликолитической функции клеток, таких как: базовый гликолиз, максимальная гликолитическая емкость и гликолитический резерв.

Уровень репликации вируса в клетках, культивируемых в среде Plasmach, был в 6-8 раз ниже, чем в стандартной среде DMEM. Исследование метаболических изменений выявило нарушения экспрессии ряда генов, включая гены, кодирующих ферменты цикла мочевины. Например, в клетках, несущих репликон ВГС, имело место заметное снижение экспрессии уровня аргиназы (ARG1). Таким образом, исследование вирус-опосредованных метаболических нарушений действительно целесообразно проводить при использовании именно физиологических сред.

Благодарности: Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ №19-74-10086.

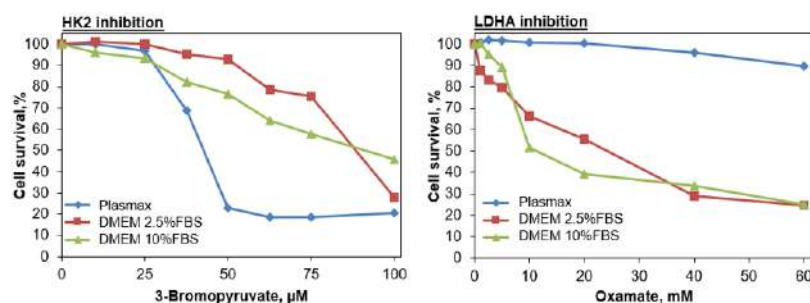


Рис. 1. Цитотоксичность клеток к ингибированию лактатдегидрогеназы и гексокиназы в классической и физиологически обоснованной среде

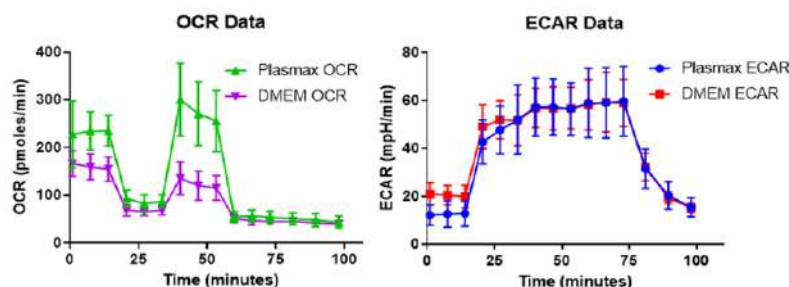


Рис. 2. Некоторые показатели митохондриального дыхания и гликолитической функции клеток в классической и физиологически обоснованной среде

Литература

1. Martin G., Bird P., and Crichton C., "Global health: Where are our priorities?," Br. Med. Bull., vol. 91, no. 1, pp. 23–28, 2009.
2. Kuna L., Jakab J., Smolic R., Wu G.Y., and Smolic M., "HCV Extrahepatic Manifestations," J. Clin. Transl. Hepatol., vol. 7, no. X, pp. 1–11, 2019.
3. Thrift A.P., El-Serag H.B., and Kanwal F., "Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease," Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol., vol. 14, no. 2, pp. 122–132, 2017.
4. Cantor J.R., "The Rise of Physiologic Media," Trends Cell Biol., vol. 29, no. 11, pp. 854–861, 2019.

Метилирование ДНК как фактор, ассоциированный со стабильностью генома

Д.В. Кривонос¹, Д.Н. Конанов¹

¹ФБГУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России

Один из основных адаптационных механизмов прокариот и клеточных мобильных элементов — высокая пластичность наследственного материала. Показано, что геномные перестройки не происходят равновероятно вдоль хромосомы, а концентрируются в отдельных участках генома — горячих точках. Целью данной работы стал поиск структурных факторов, отличающих горячие точки от консервативных участков генома.

Объектом исследования стали 215 полногеномных сборок различных штаммов для 10 организмов из семейства *Enterobacteriaceae*. Для каждого вида было проведено множественное выравнивание с целью определения гомологичных участков (блоков гомологии). Блоки гомологии были рассчитаны с помощью двух инструментов: Mauve и Sibelia. В Mauve использовались стандартные параметры, установленные по умолчанию. В Sibelia использовался стандартный параметр loose[1; 2].

Мы определили центральные части блоков гомологии как консервативные фрагменты, краевые части (окружающие места разрыва консервативных участков) как изменчивые. В качестве краевых были рассмотрены фрагменты в 10, 20, 50, 150 п.н. и по 10% от всей длины блоков.

Было проведен анализ k-мерного состава краевых и центральных фрагментов. Частота представления каждого k-мера рассчитывалась по формуле.

$$frequency_i = \frac{N_i}{length(sequence)-(k-1)} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где N_i количество анализируемого i-го k-мера, $length(sequence)$ — длина последовательности, k-длина k-мера.

Для сравнения частоты встречаемости отдельных k-меров краевых и центральных участков было использовано отношение частот встречаемости:

$$ratio_i = \frac{frequency\ in\ ends_i}{frequency\ in\ middle_i} \quad (2)$$

В анализ были включены k-меры длиной от 2 до 4 нуклеотидов.

В ходе анализа k-мерного состава было выявлен значимый рост частоты встречаемости димеров GC/CG в консервативных участках по сравнению с краевыми ($p\text{-value} = 1,9 \cdot 10^{-11}$, U-критерий Манна Уитни). Известно, что CG является одним из распространенных в семействе *Enterobacteriaceae* сайтов метилирования. С другой стороны, метилирование играет известную роль в процессах репарации, регуляции рестрикции, а также ассоциировано с патогенностью и иммунизацией [3–5].

На основе этих фактов была выдвинута гипотеза о роли метилирования в расположении мест разрыва блоков. Для проверки гипотезы был проведен анализ еще одного классического сайта метилирования, GATC, который является нейтральным по GC-составу, что исключает влияние простой представленности 1-меров. Была рассмотрено отношение частот встречаемости между краевыми и центральными фрагментами блоков для этого мотива в сравнении с случайными 4-мерами. Сравнение показало значимую перепредставленность мотива GATC в консервативных фрагментах по сравнению с краевыми ($p\text{-value} = 8,63 \cdot 10^{-8}$, U-критерий Манна Уитни), что укрепило исходную гипотезу.

Для экспериментальной проверки наблюдаемого эффекта были использованы внешние данные метилирования генома *E. coli* K-12 MG1655 [6]. Ожидаемо, частота встречаемости фактически заметилированных оснований была выше в консервативных фрагментах по сравнению с краевыми ($p\text{-value} = 5,64 \cdot 10^{-19}$, U-критерий Манна Уитни).

K-мерный состав консервативных участков генома значимо отличается от k-мерного состава фрагментов с высокой частотой геномных перестроек. При этом отличие носит направленный характер и особенно выражено для k-меров, являющихся классическими сайтами метилирования.

Эффект ожидаемо проявляется и в экспериментальных данных метилирования. Таким образом, метилирование генома оказалось ассоциировано с расположением разрыва консервативных блоков генома.

Литература

1. Darling A.C.E., Mau B., Blattner F.R., Perna N.T. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements//Genome Research. - 2004. - V.14. - Mauve. - №7. - P. 1394-1403.
2. Minkin I., Patel A., Kolmogorov M., Vyahhi N., Pham S. Sibelia: A Scalable and Comprehensive Synteny Block Generation Tool for Closely Related Microbial Genomes / I. Minkin et al. // Algorithms in Bioinformatics : Lecture Notes in Computer Science / coll. D. Hutchison et al.; eds. A. Darling, J. Stoye. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. - 2013. – Vol. 8126. – Sibelia. – P. 215-229.
3. Wojciechowski M., Czapinska H., Bochtler M. CpG underrepresentation and the bacterial CpG-specific DNA methyltransferase M.MpeI//Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. - V.110. - №1. - P. 105-110.
4. Tsukamoto Y., Tamura T., Maeda Y., Miyake K., Ato M. N6-methylated adenine on the target sites of mamA from Mycobacterium bovis BCG enhances macrophage activation by CpG DNA in mice//Tuberculosis (Edinburgh, Scotland). - 2020. - V.121
5. Kim T.H., Kim D., Lee H., Kwak M.H., Park S., Lee Y., Kwon H.J. CpG-DNA induces bacteria-reactive IgM enhancing phagocytic activity against Staphylococcus aureus infection//BMB Reports. - 2019. - V.52. - №11. - P. 635-640.
6. Rand A.C., Jain M., Eizenga J.M., Musselman-Brown A., Olsen H.E., Akesson M., Paten B. Mapping DNA Methylation with High Throughput Nanopore Sequencing//Nature methods. - 2017, - V. 14. - № 4. - P. 411-413.

УДК 57.052

Неравновесная модель короткодействующей репрессии при регуляции транскрипции генов

Ф.Е. Гарбузов¹, В.В. Гурский¹

¹Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук

Экспрессия генов является основополагающим процессом в жизнедеятельности клетки, в ходе которого синтезируются мРНК и белки, закодированные в молекуле ДНК. Белки, называемые транскрипционными факторами, регулируют транскрипцию генов – первого этапа экспрессии. Существует два типа транскрипционных факторов: активаторы, повышающие вероятность начала транскрипции, и репрессоры, понижающие её. Один из видов репрессоров – короткодействующие репрессоры – связываются с ДНК, делая недоступными для активаторов небольшие участки ДНК возле места посадки и, таким образом, оказывают не прямое репрессивное воздействие на ген. Этот процесс обычно моделируется в предположении о том, что система находится в термодинамическом равновесии [1].

Перед началом транскрипции гена происходит ремоделинг хроматина, то есть раскрытие части ДНК, содержащей ген и его регуляторную последовательность. Этот процесс, а также ряд других процессов, протекающих во время транскрипции, являются диссипативными, что делает приближение термодинамического равновесия достаточно грубым упрощением [2]. Ещё один недостаток равновесного подхода связан с тем, что он учитывает не все возможные конфигурации регуляторной последовательности гена [3, 4].

В работе исследована более общая неравновесная модель короткодействующей репрессии при помощи графового формализма [5], в рамках которого система является марковским процессом (рис. 1). Неравновесность такой модели обусловлена нарушением фундаментального ограничения на равновесные системы – соотношения детального баланса, согласно которому поток вероятности от состояния i к состоянию j должен быть равен обратному потоку от j к i .

При помощи метода производящей функции выведены аналитические формулы среднего и дисперсии количества продуктов транскрипции, а также проведено сравнение неравновесной модели с равновесной с точки зрения силы репрессии и шума в транскрипции.

Выделяется два механизма короткодействующей репрессии, первый из которых связан с увеличением вероятности закрытия хроматина, а второй – с уменьшением вероятности его открытия. Новая неравновесная модель, в отличие от равновесной, позволяет разделить эти два механизма на уровне среднего количества продуктов транскрипции. При описании экспериментальных данных

[6] об экспрессии генов, контролирующих развитие эмбриона дрозофилы, неравновесная модель показывает большую точность по сравнению с равновесной. Кроме того, она предсказывает, что механизм репрессии, увеличивающий вероятность закрытия хроматина, предпочтителен в этой системе.

Представленный подход может быть применен к более сложным генным сетям и использован для вывода моделей и параметров регуляции транскрипции по данным об экспрессии генов.

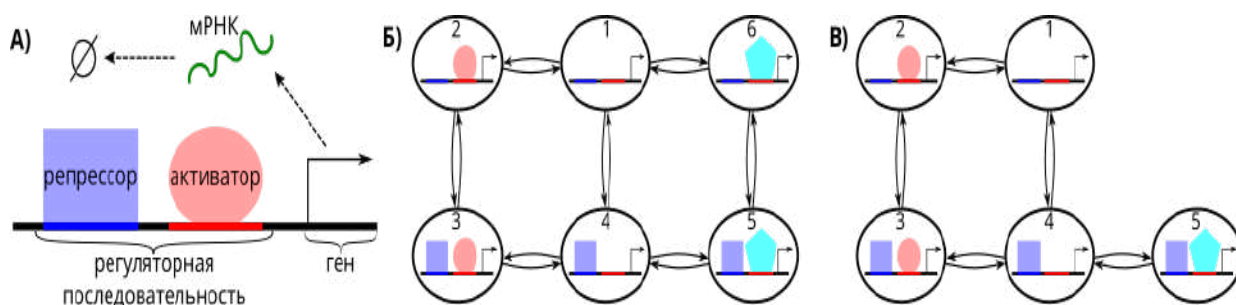


Рис. 1. Графовая модель. А) Схема процесса транскрипции гена, регуляторная последовательность которого состоит из сайта активатора и сайта репрессора. В) Граф всевозможных состояний регуляторной последовательности и переходов между ними. В состояниях 5 и 6 сайт активатора закрыт нуклеосомой. С) Граф состояний в упрощенной равновесной модели.

Литература

1. Ay A., Arnosti D.N. Mathematical modeling of gene expression: a guide for the perplexed biologist // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2011. V. 46. № 2. P. 137-151.
2. Wong F., Gunawardena J. Gene Regulation in and out of Equilibrium // *Annual Review of Biophysics*. 2020. V. 49. № 1. P. 199-226.
3. Kozlov K., Gursky V., Kulakovskiy I., Samsonova M. Sequence-based model of gap gene regulatory network // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. № Suppl 12. P. S6.
4. Kozlov K., Gursky V., Kulakovskiy I., Dymova A., Samsonova M. Analysis of functional importance of binding sites in the Drosophila gap gene network model // *BMC Genomics*. 2015. V. 16. № Suppl 13. P. S7.
5. Ahlendorf T., Wong F., Eils R., Gunawardena J. A framework for modelling gene regulation which accommodates non-equilibrium mechanisms // *BMC Biology*. 2014. V. 12, № 1, P. 102.
6. Fakhouri W.D., Ahmet A., Sayal R., Dresch J., Dayringer E., Arnosti D.N. Deciphering a transcriptional regulatory code: modeling short-range repression in the Drosophila embryo // *Molecular Systems Biology*. 2010. V. 6, №1, P. 341.

УДК 578.52

Обнаружение нового представителя рода *Atadenovirus* в биологических образцах позвоночных с использованием методики, подобной метабаркодингу

А. Д. Мацевай^{1,2}, И. М. Михайлов^{1,3}, Д. А. Киселев^{1,4}, К. Ф. Хафизов^{1,2}, Г. А. Шипулин¹

¹ ФГБУ «Центр стратегического планирования» ФМБА РФ

² ФГАОУВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

³ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

⁴ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России

Обнаружение и идентификация новых вирусных патогенов в биологических образцах, в частности, клиническом материале, представляется актуальной задачей. Среди причин появления и распространения новых вирусных патогенов можно выделить следующие факторы: глобализация, климатические изменения, увеличение плотности населения и др. В последние годы было показано, что оптимальным подходом к решению этой задачи является изучение фрагментов геномов новых вирусов методом высокопроизводительного секвенирования [1].

Классический метод метабаркодинга, используемый для таксономической классификации эукариот и бактерий (например, по локусам ITS и 16S, соответственно), не пригоден для широких

групп вирусов, поскольку геномы вирусов не располагают локусами, подходящими для использования в качестве «штрихкодов». В то же время, метагеномные исследования, позволяющие получать полные геномные последовательности, отличаются высокой стоимостью лабораторной части, а также потребляют значительную долю мощности секвенирующей платформы.

Коллективом авторов был разработан новый метод идентификации неизвестных вирусных патогенов, принципиально схожий с методом метабаркодинга [2]. Был создан биоинформатический алгоритм, использующий репрезентативные геномы широких групп вирусов для создания праймеров для ПЦР. В результате достигается широкое таксономическое покрытие, потенциально позволяющее амплифицировать и использовать для таксономической идентификации фрагменты геномов не только известных, но и новых вирусных патогенов. Особенно важным является способность алгоритма подбирать такие фрагменты для таксономически гетерогенных групп вирусов, объединённых в группу на основе клинической картины вызываемых ими инфекций (например, респираторных или кишечных).

Было проведено поисковое исследование, направленное на обнаружение неизвестных вирусных патогенов в биологических образцах позвоночных. В ходе работы с помощью методики, описанной выше, в одном из образцов был идентифицирован новый, т.е. прежде не описанный, представитель рода *Atadenovirus*.

Для детального изучения полной геномной последовательности обнаруженного вируса было применено метагеномное секвенирование. В результате сборки *de novo* из коротких прочтений была получена сборка общей длиной ~22 тыс. пн, содержащая последовательности генов, стандартно используемых для филогенетического анализа аденовирусов: *pVII*, *penton*, покрытие которых составило 100%, *hexon* (покрытие 80%), *fiber* (покрытие 95%). Высокое покрытие перечисленных генов, а также качество полученной сборки позволили провести филогенетический анализ, подтвердивший результат таксономической классификации, осуществлённой авторским алгоритмом, и отнести новый вирус к роду *Atadenovirus*. Для более точного определения таксономической дистанции применяется филогенетический анализ гена ДНК-полимеразы, секвенирование которого будет осуществляться по методу Сэнгера.

Таким образом, использование разработанного метода изучения фрагментов вирусных геномов позволяет проводить таксономическую идентификацию новых вирусных патогенов без использования затратного метагеномного подхода. На примере изучения биологических образцов позвоночных была показана эффективность разработанной праймерной панели, а также была показана разрешающая способность амплифицируемых фрагментов генома для идентификации нового представителя рода *Atadenovirus*. В перспективе использование описанной системы может способствовать более быстрому и экономически целесообразному, по сравнению с используемыми методами, обнаружению и идентификации новых вирусных патогенов, в частности, при исследовании образцов по принципу синдромального подхода.

Литература

1. J. Cheval u др., «Evaluation of High-Throughput Sequencing for Identifying Known and Unknown Viruses in Biological Samples», J. Clin. Microbiol., т. 49, вып. 9, сс. 3268–3275, сен. 2011, doi: 10.1128/JCM.00850-11.
2. A. Matsvay u др., «Metabarcoding-Like Approach for High Throughput Detection and Identification of Viral Nucleic Acids», Proceedings, т. 50, вып. 1, с. 136, июл. 2020, doi: 10.3390/proceedings2020050136.

УДК 577.121

Оптимизация метаболизма *Escherichia coli* для продукции яблочной кислоты по оксидативной ветви цикла трикарбоновых кислот из глюкозы

Н.В. Красильникова^{1,2}, А.Ю. Гулевич¹, А.Ю. Скороходова¹

¹ ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

² ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Яблочная кислота относится к веществам-«строительным блокам», которые могут служить универсальными и удобными предшественниками в последующем химическом синтезе целого спектра веществ с высокой добавленной стоимостью, включая растворители и полимеры для использования в лакокрасочной, текстильной, автомобильной, фармакологической и других отраслях

промышленности. В настоящее время яблочную кислоту получают энерго- и ресурсозатратным нефтехимическим синтезом. Однако, являясь интермедиатом центрального метаболизма множества микроорганизмов, яблочная кислота может быть получена в ходе микробиологического синтеза из возобновляемого сырья, в первую очередь – сахаров растительной биомассы.

Основными природными продуцентами яблочной кислоты являются плесневые грибы *Aspergillus flavus*, способные накапливать L-яблочную кислоту в высоких концентрациях в ходе аэробной утилизации субстрата, однако использование их в качестве промышленно значимых продуцентов осложнено в виду продуцирования ими афлатоксинов в среду [1].

Альтернативу природным продуцентам яблочной кислоты может составлять факультативно анаэробная бактерия *Escherichia coli*, часто используемая как в лабораториях для проведения различных исследований, так и для получения штаммов-продуцентов метаболитов и биологически активных веществ для крупнотоннажной промышленности [2]. Выбор этой бактерии в качестве платформы для конструирования продуцентов полезных метаболитов в общем случае обусловлен достаточной изученностью генома, доступностью методов метаболической инженерии и генно-инженерного инструментария, а также высокой скоростью роста культуры и неприхотливостью к питательным компонентам. Яблочная кислота является центральным метаболитом цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) у данной бактерии в ходе аэробной утилизации углеродного субстрата. Высокий выход продукта можно обеспечить путем оптимизации метаболизма бактерии с использованием современных методов генной инженерии для редактирования генома.

В настоящей работе показано поэтапное конструирование и характеристика рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, способного к синтезу яблочной кислоты как основного секретируемого продукта метаболизма при утилизации глюкозы с участием оксидативной ветви ЦТК.

В качестве базового был использован ранее сконструированный рекомбинантный штамм *Escherichia coli* MSG 1.0 $\Delta aceBAK \Delta glcB$ (MG1655 $\Delta ackA-pta$, $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, $P_L glk$, $P_{tac} galP$, $\Delta aceBAK$, $\Delta glcB$) из коллекции лаборатории [3]. Для достижения цели работы были поставлены и решены следующие задачи: В качестве мишеней для дальнейшего осуществления генетических модификаций, способных обеспечить эффективный синтез рекомбинантными штаммами яблочной кислоты из глюкозы по оксидативной ветви ЦТК были выбраны гены *mdh*, *sfcA*, *maeB*, и *mgo*, кодирующие малатдегидрогеназу, НАДН⁺- и НАДФ⁺-зависимые малатдегидрогеназы и малат:хинон оксидоредуктазу, подлежащие инактивации в базовом штамме. Для эффективного функционирования оксидативного ЦТК в штаммах была обеспечена активность синтетического обходного пути 2-кетоглутарат – сукцинатполуальдегид - янтарная кислота за счет экспрессии в штаммах гена *kgd* *Mycobacterium tuberculosis*, кодирующего 2-кетоглутаратдекарбоксилазу.

Целевые генетические модификации были исходно получены в хромосоме штамма *E. coli* MG1655 с использованием метода рекомбинационной инженерии, основанного на применении систем гомологичной (Red) и сайт-специфической (Int/Xis) рекомбинации фага лямбда и затем последовательно введены в хромосому базового штамма серий последовательных трансдукций. Ген *kgd* введен в штаммы в составе плазмиды pMW119-*kgd*. Наличие целевых генетических модификаций в хромосоме подтверждали ПЦР-анализом.

При характеристике серии полученных штаммов в ходе аэробного культивирования показано, что способностью к значимой продукции яблочной кислоты из глюкозы с коэффициентом конверсии достигающим ~0,16 моль/моль обладал лишь штамм MSG 1.0 $\Delta aceBAK \Delta glcB \Delta mdh \Delta maeB \Delta sfcA \Delta mgo$ pMW119-*kgd*, несущий полный набор выбранных генетических модификаций. Данный факт объяснялся тем, что в результате объединения делеций всех соответствующих генов, только указанный штамм был лишен всех биохимических путей, протекающих с утилизацией яблочной кислоты. Тем не менее, штамм секретировал подавляющую часть утилизированной глюкозы в виде пировиноградной кислоты, что указывало на низкую эффективность функционирования в штамме оксидативного ЦТК за счет резкого снижения внутриклеточного пула щевелевоуксусной кислоты в результате прекращения конверсии в соответствующий метаболит яблочной кислоты и недостаточной интенсивности протекания анаплеротических реакций.

Сконструированный штамм оптимизировали за счет введения в хромосому гена *pusA* *Bacillus subtilis*, кодирующего пируваткарбоксилазу. Наличие в штамме природно отсутствующей у *E. coli* пируваткарбоксилазы должно было способствовать эффективной конверсии пировиноградной кислоты в щевелевоуксусную. В результате, итоговый штамм MSG 1.0 $\Delta aceBAK \Delta glcB \Delta mdh \Delta maeB \Delta sfcA \Delta mgo$ *poxB:: $\lambda attB$ -P_L-pusA* pMW119-*kgd*, был способен аэробно синтезировать яблочную кислоту из глюкозы с выходом 0,58 моль/моль, составляющим 58% от соответствующего теоретиче-

ского максимума. Значение коэффициента конверсии субстрата в целевой продукт, демонстрируемое сконструированным и охарактеризованным в работе штаммом продуцентом яблочной кислоты, превосходит показатели известных из литературы штаммов ближайших аналогов. Кроме того, штамм имеет дальнейшие перспективы для усовершенствования и повышения степени аэробной конверсии глюкозы в яблочную кислоту.

Литература

1. Battat E., [et al.] Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor // *Biotechnol. Bioeng.* – Vol. 37. – №11. – 1991. – P. 1108–1116.
2. Becker J., Wittmann C. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for the heterologous production of high value molecules-a veteran at new shores // *Curr. Opin. Biotechnol.* – Vol. 42. – 2016. – P. 178-188.
2. Скороходова А.Ю., [и др.] Конструирование синтетического обходного пути для улучшения аэробного синтеза янтарной кислоты по оксидативной ветви цикла трикарбоновых кислот рекомбинантными штаммами *Escherichia coli* // *Прикладная биохимия и микробиология.* – Т. 54. – №3. – 2018. – С. 244–252.

УДК 578.233.36

Нокаут сиалитрансфераз, как стратегия формирования резистентности к вирусу гриппа А

Н.А. Оняно¹, О.В. Глазова, П.Ю. Волчков¹

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

На сегодняшний день разработан ряд подходов для борьбы с вирусом гриппа: это разные вакцины [1] и химические ингибиторы [2]. Наиболее привлекательным является ингибирование связывания вирусной частицы с поверхностью клетки и последующего проникновения, так как такая стратегия обеспечит клеточную защиту на самых начальных этапах. Для прикрепления к клетке вирус использует НА (hemagglutinin, гемагглютинин) - главный поверхностный антиген вируса, расположенный на мембране вирусной частицы и ответственный за связывание с рецепторами хозяйской клетки и последующим слиянием оболочки вириона и плазматической мембраны [3]. Эпитопами хозяйской клетки для вируса гриппа А и В являются остатки сиаловых кислот [4]. Перенос остатков сиаловых кислот от сиалированного цитидинмонофосфата (CMP-Sia) на концевую позицию сахаров в гликолипидах и гликопротеинах катализируется семейством ферментов, называемых сиалилтрансферазами.

В данной работе предполагалось оценить влияние снижения количества сиаловых остатков на поверхности клетки-мишени на эффективность проникновения и репликации вируса гриппа А. С помощью системы CRISPR-Cas9 были получены клеточные линии DF1 с нокаутом нескольких сиалилтрансфераз (ST3Gal2, ST3Gal3 и ST3Gal5). Нокауты были подтверждены методом qPCR. Оценка эффективности вирусной репликации проводилась методом qPCR с измерением количества вирусных геномов в среде инфицированных клеток. Также был измерен уровень сиалирования клеток методом Lectins binding assay.

Литература

1. Soema PC et al., 2015, Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies
2. Eyer L & Hruska K, 2013, Immune Responses to Influenza Virus and Its Correlation to Age and Inherited Factors
3. Skehel JJ & Wiley DC, 2000, Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin
4. Ito T, 2000, Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins

Оптимизация протокола идентификации CNV по данным экзомного секвенирования

Д.М. Тарасова^{1,2}, В.Д. Гордеева^{1,2}, Г.П. Араниди²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Федеральное государственное бюджетное учреждение федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины федерального медико-биологического агентства

Вариации числа копий участков ДНК (CNV) являются одним из важных источников геномной изменчивости наряду с однонуклеотидными вариациями (SNV), инсерциями и делециями. Согласно последним исследованиям, регионы, варьируемые по числу копий, затрагивают около 10% генома и могут иметь значительный эффект на фенотип. Перечень заболеваний, ассоциированных с такими структурными вариациями, включает аутизм, шизофрению, сердечно-сосудистые заболевания, болезнь Хантингтона и несколько других расстройств [1].

Несмотря на клиническую значимость CNV недостаточно изучены. Это связано со сложностью детекции такого широкого спектра вариаций. В настоящее время технологии секвенирования следующего поколения (NGS) сделали возможным детектирование CNV от 50 пн до нескольких мегабаз. Большинство инструментов, созданных для поиска CNV, направлено на работу с данными полного геномного секвенирования (WGS) или полного экзомного секвенирования (WES) [2]. Однако применение WGS в генетической диагностике ограничено высокой стоимостью анализа и сложностью биоинформатической обработки большого массива данных, в связи с чем, идентификация CNV по данным WES стала более востребованной, и, как следствие, возросла потребность в более точных и эффективных методах.

Одним из широко используемых алгоритмов является EXCAVATOR2, который основан на анализе покрытия как целевых участков, так и нецелевых участков [3]. Он применяет трехэтапную систему нормализации и анализирует отношение покрытий тестового и референсных образцов. Таким образом, выбор референса может сильно повлиять на результаты предсказаний. К сожалению, на данный момент нет общепринятой процедуры, а использование всех возможных образцов в качестве референса для EXCAVATOR2 приводит к низким показателям точности (precision = 2,9%) и полноты (recall = 44,9%).

В рамках этой работы мы разрабатываем подход для выбора оптимального референсного набора образцов с целью повышения эффективности детекции CNV. Для анализа использовались данные подэкзомного секвенирования Illumina Truseq Exome Kit и результаты хромосомного микроматричного анализа Agilent SurePrint G3 CGH+SNPArrayKit.

Литература

1. Shaikh TH. Copy Number Variation Disorders. Curr Genet Med Rep. (2017).
2. Zhao M., Wang, Q., Wang, Q. et al. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. BMC Bioinformatics 14, S1 (2013).
3. D'Aurizio R., Pippucci T., Tattini L., Giusti B., Pellegrini M., Magi A. – Enhanced copy number variants detection from whole-exome sequencing data using EXCAVATOR2. Nucleic Acids Res. (2016).

Поиск новых интеракторов Р73 при помощи проксимального мечения

Д.В. Луппов, Н.Б. Пестов

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Белки семейства транскрипционных факторов р53, такие как р53, р63 и р73 и множество их изоформ, играют огромную роль в канцерогенезе и функционировании организма в целом. В нашем исследовании мы сосредоточили свое внимание на белке р73, который до сих пор изучен значительно хуже, чем р53. Разнообразие изоформ р73 значительно выше, чем у других белков этого семейства. Особо можно выделить два типа: ТАр73 – изоформы, обладающие N-терминальным доменом активации транскрипции и DNp73, утерявшие данный домен из-за использования альтернативного промотора. Подытоживая предыдущие исследования можно сказать, что данный белок вовлечен во многие процессы, важные для прогрессии опухоли. Большинство исследований склоняются

к тому, что DN изоформа является про-канцерогенной, в то время как ТА изоформа проявляет онкосупрессорные свойства.

В нашем исследовании для изучения взаимодействий различных изоформ данного белка мы использовали систему проксимального мечения TurboID. Данная система представляет собой белок, полученный при помощи молекулярной эволюции из биотинлигазы *E.coli* Bir-A, активность которой была многократно усилена. Этот белок способен ковалентно присоединять биотин к остаткам лизина в различных белках, после чего меченные таким образом белки могут быть выявлены и выделены из смеси при помощи стрептавидиновых или подобных им гранул. В нашей работе используются обе версии разработанного белка – полноразмерный TurboID, и менее стабильный и активный, но более компактный и дающий меньше неспецифичного сигнала miniTurbo.

Нами были созданы несколько генетических конструкций, кодирующих химерные белки, представляющие из себя p73, связанный через линкер с биотинлигазой. Данные конструкции были протестированы в различных клеточных линиях, при различных температурах, способах выделения образца (варьировались условия лизиса клеток, вытягивания при помощи магнитных частиц, покрытых стрептавидином и визуализации иммуноблоттингом). Оптимизирована специфичность биотинилирования созданными нами белками, оценена их активность с различными версиями биотинлигазы, показана активность в широком диапазоне температур. Первым успешным результатом явилась детекция олигомеризации p73 в условиях транзientной экспрессии.

Литература

1. Rufini, A., Agostini, M., Grespi, F., Tomasini, R., Sayan, B. S., Niklison-Chirou, M. V., Conforti, F., Velletri, T., Mastino, A., Mak, T. W., Melino, G., & Knight, R. A. (2011). p73 in Cancer. *Genes & Cancer*, 2(4), 491–502. <https://doi.org/10.1177/1947601911408890>
2. Kaelin, W. G. (1999). The p53 gene family. In *Oncogene* (Vol. 18, Issue 53, pp. 7701–7705). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202955>
3. Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., Feldman, J. L., Perrimon, N., & Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*, 36(9), 880–898. <https://doi.org/10.1038/nbt.4201>

УДК 577.21

Полиморфизмы генов *FAD3*, определяющие содержание линоленовой кислоты в льняном масле, и тест-система для их идентификации

Л.В. Повхова^{1,2}, П. Кезимана^{2,3}, Т.А. Рожмина^{2,4}, А.А. Дмитриев², Н.В. Мельникова²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

³Российский университет дружбы народов, Москва

⁴ФГБНУ Федеральный научный центр лубяных культур

Лён (*Linum usitatissimum* L.) – ценная сельскохозяйственная культура, которая выращивается для получения семян и волокна во многих странах. В зависимости от содержания линоленовой (LIN), линолевой (LIO) и олеиновой (OLE) кислот льняное масло используется в фармацевтической, пищевой и полимерной промышленности, при производстве кормов и композитных материалов [1]. У большинства сортов льна масло содержит около 50-60% линоленовой кислоты, однако в пищевой промышленности используются сорта преимущественно с низким (менее 5%) содержанием LIN, характеризующиеся более длительным сроком хранения. Гены *FAD3* (fatty acid desaturase 3) играют ключевую роль в синтезе жирных кислот, катализируя переход из LIO в LIN. Известно, что некоторые аллели этих генов ассоциированы с определённым составом льняного масла [2]. Однако информации недостаточно, что затрудняет развитие маркер-ориентированной селекции льна в этом направлении. Целью нашего исследования являлись установление полиморфизмов, определяющих содержание линоленовой кислоты в льняном масле, и разработка тест-системы для их идентификации.

Для исследования использовано 84 сорта/линии льна из коллекции Института льна (г. Торжок) с различным содержанием LIN (от 2.7 до 65.3%) и LIO (от 11.9 до 72.4%) в масле. Чтобы учесть внутрисортную гетерогенность, ДНК выделяли из пула в 40-50 проростков. Подготовка ДНК-библиотек проводилась с использованием двухстадийной ПЦР. Для определения последовательности

генов *FAD3A* и *FAD3B* выполнено секвенирование на платформе Illumina (США). В результате получены прочтения длиной 300+300 нуклеотидов со средним покрытием 300х, что позволило с высокой точностью и с учетом внутрисортной гетерогенности определить полиморфизмы в генах *FAD3*. С использованием программы VarScan [3] для генов *FAD3A* и *FAD3B* идентифицировано 91 и 62 полиморфизма соответственно. Корреляционный анализ выявил однонуклеотидные полиморфизмы, ассоциированные с содержанием жирных кислот в льняном масле. Все, кроме одного, образцы с низким содержанием LIN (2.7-4.9%) и высоким содержанием LIO (64-72.4%) несли как замену триптофана на стоп-кодон в гене *FAD3A*, так и замену гистидина на тирозин в гене *FAD3B*, в то время как все исследованные высоколиноленовые сорта и линии не имели ни одного из этих полиморфизмов. Образцы только с одной из этих двух замен обладали средним содержанием LIN (от 32.6 до 46.8%). В оставшемся низколиноленовом образце обнаружен другой полиморфизм в гене *FAD3A*, встречающийся только в этом сорте из всей анализируемой коллекции, приводящий к замене аргинина на стоп-кодон.

Для идентификации каждого из трех установленных ключевых полиморфизмов, определяющих содержание линоленовой кислоты в масле, разработана тест-система на основе ПЦР с последующим анализом кривых плавления высокого разрешения (HRM, high resolution melting). Праймеры, специфичные к консервативным регионам, подобраны с учетом всех полиморфизмов, обнаруженных нами и другими исследователями [4, 5]. HRM-анализ с предварительной амплификацией проводили на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Нидерланды) в трех технических повторностях. Использована следующая программа ПЦР: 95°C в течение 10 минут, затем 40 циклов 95°C – 15 секунд и 60°C – 60 секунд. HRM-анализ проведен в температурном интервале от 65°C до 85°C с шагом в 0.1°C. Гомозиготные и гетерозиготные по ключевому полиморфизму образцы отчетливо различаются по температурному сдвигу в кривых плавления (рис. 1), что позволяет использовать данный метод для идентификации полиморфизмов, определяющих содержание LIN и LIO в льняном масле.

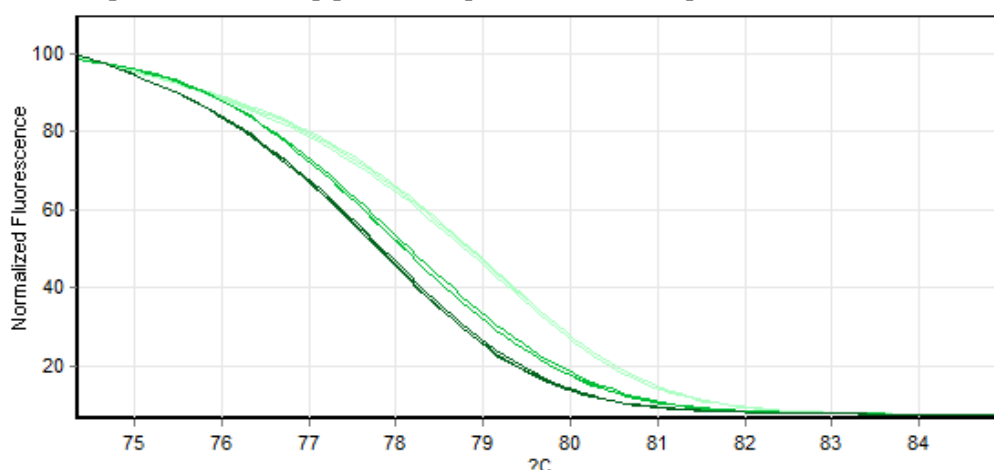


Рис. 1. Кривые плавления высокого разрешения для гомозиготных и гетерозиготных по одному из ключевых полиморфизмов, приводящему к замене His на Tyr в гене *FAD3B*, образцов.

Разработанная тест-система необходима для маркер-ориентированной селекции сортов льна с заданным содержанием линоленовой кислоты в масле, а также контроля сортовой чистоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-08036.

Литература

1. Пороховинова Е. А. и др. Биохимическое разнообразие льна по жирнокислотному составу семян в генетической коллекции ВИР и влияние условий среды на его проявление // Экологическая генетика. 2016. Т. 14. № 1.
2. Thambugala D., et al. Genetic variation of six desaturase genes in flax and their impact on fatty acid composition // TAG Theoretical and applied genetics. 2013. 126(10): 2627-2641.
3. Koboldt D.C., et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. Genome Res. 2012. 22(3): 568-576.
4. Лемеш В. А. и др. Полиморфизм *sad* и *fad* генов десатураз льна (*Linum usitatissimum* L.) // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. 2017. Т. 61. № 6. С. 58–65.
5. Пороховинова Е.А. и др. Полиморфизм генов, контролирующих низкое содержание линоленовой кислоты, у линий генетической коллекции льна ВИР // Экологическая генетика. 2019. Т. 17. № 2. С. 5–19.

Получение высококачественной сборки генома тополя *Populus x sibirica* для определения структуры полового локуса

Е.М. Дворянинова^{1,2}, Е.Н. Пушкова², Г.С. Краснов², Н.В. Мельникова², А.А. Дмитриев²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Тополь *Populus x sibirica*, широко распространенный на территории Москвы и Московской области, относится к двудомным растениям, обладающим XY-системой определения пола. Получение последовательности генома *P. x sibirica* имеет фундаментальное значение, поскольку представители рода *Populus* являются модельными объектами для генетических исследований деревьев, а также характеризуется высоким генетическим разнообразием [1]. Кроме того, структура и расположение полового локуса различны среди видов рода *Populus* [2, 3], поэтому данные о строении полового локуса *P. x sibirica* расширяют знания в области генетики пола тополей и двудомных растений в целом.

Целью данной работы являлось получение высококачественных сборок геномов мужского и женского растений *P. x sibirica* и установление последовательности и локализации полового локуса. Для ее достижения использована комбинация данных секвенирования, полученных с помощью платформ Oxford Nanopore Technologies (ONT, Великобритания) и Illumina (США) с длинными и высокоточными прочтениями соответственно. Материал для секвенирования собран с мужского и женского растений в период цветения. Чистая высокомолекулярная ДНК выделена из замороженных листьев согласно разработанной нами методике на основе ЦТАБ и набора Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen, США). ДНК-библиотеки подготовлены в соответствии со стандартными протоколами производителей, а затем секвенированы на платформах Illumina (HiSeq 2500, 125+125 п.н.) и ONT (MinION, ячейки R9.4.1 и R10.0) с предварительной очисткой от коротких фрагментов (Circulomics Short Read Eliminator Kit, США).

После секвенирования ДНК мужского растения получено 32 млрд. н. на платформе ONT и 36 млн. прочтений на платформе Illumina, а для женского растения – 23 млрд. н. (ONT) и 52 млн. прочтений (Illumina). Биоинформатическая обработка прочтений Nanopore включала распознавание нуклеотидов приложением Guppy 3.6.1, удаление последовательностей адаптеров приложением Porechop, фильтрацию по качеству с применением Trimmomatic 0.39. Прочтения Illumina были обрезаны по качеству и отфильтрованы по длине также приложением Trimmomatic. Первичная сборка геномов производилась с использованием прочтений Nanopore и нескольких приложений: Canu 2.1, Flye 2.8, Raven 1.1.10, Shasta 0.5 и wtdbg2 2.5. Далее полученные сборки были отполированы прочтениями Nanopore с помощью Racon 1.4.3 и Medaka 1.0.3, а также прочтениями Illumina с использованием POLCA (MaSuRCA 3.3.9). Результат работы программ-сборщиков оценивали по статистикам QUAST и наличию консервативных последовательностей (BUSCO).

После проведения первичной сборки геномов несколькими приложениями обнаружено, что наилучшие показатели соответствуют сборкам с использованием Canu (табл. 1). Общие длины сборок оказались выше ожидаемой (около 500 млн п.н.), что указывает на наличие разделенных гаплогеномов (*P. x sibirica* является межсекционным гибридом).

	XY	XX
Общая длина сборки, млн п.н.	826	824
Количество контигов	1712	3296
Наибольший контиг, млн п.н.	7,8	3,6
GC (%)	34,14	33,89
N50, т.п.н.	1511	516
L50	154	416

Таблица 1. Статистики QUAST для сборок мужского (XY) и женского (XX) растений.

После полировки сборок прочтениями с платформы ONT приложениями Racon в двух итерациях и Medaka полнота сборки составила 98,27% для мужского растения и 97,83% для женского

(согласно BUSCO). Полировка прочтениями Illumina приводила к унификации гаплотипов. Мы решили их сохранить, поэтому финальные версии сборок не были отполированы POLCA.

При выравнивании (приложение LAST) полученной сборки генома мужского растения *P. x sibirica* на геном мужского растения *P. trichocarpa* [4], в наших данных обнаружены два контига с высокой гомологией к половому локусу [5]. Один из них содержал 5 генов, ассоциированных с полом тополя, а также частичные инвертированные повторы гена *ARR17* (рис. 1), что указывает на принадлежность локуса к Y хромосоме, а второй – только пять генов (X хромосома). При повторении процедуры для полученной сборки генома женского растения идентифицированы две области со схожей с половым локусом последовательностью, которые представляли собой альтернативные гаплотипы X хромосомы и не содержали частичных повторов *ARR17*.

Полученные результаты способствуют лучшему пониманию молекулярных механизмов определения пола растений и позволят разработать простую и надежную тест-систему для его идентификации у тополей, распространенных на территории Европейской части РФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 18-34-20113 мол_а_вед.

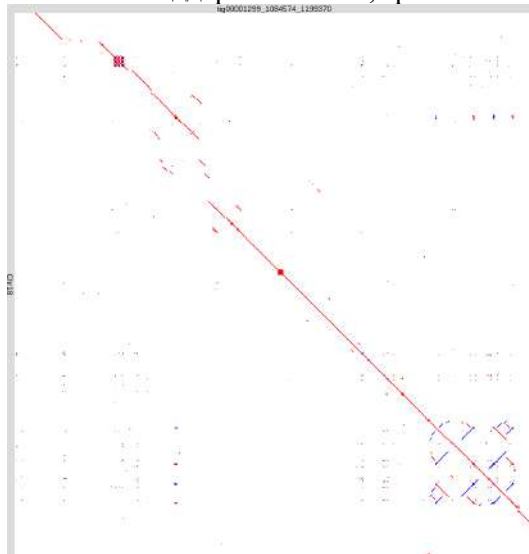


Рис. 1. Выравнивание контига из полученной сборки генома мужского растения *P. x sibirica* (ось абсцисс) на половой локус мужского растения *P. trichocarpa* (ось ординат, Chr18: 16 200 000 – 16 320 000).

Литература

1. Liu Y.J. et al. De novo assembly of white poplar genome and genetic diversity of white poplar population in Irtys River basin in China // Science China Life Sciences. 2019. V. 62, N. 5. P. 609-618.
2. Geraldts A. et al. Recent Y chromosome divergence despite ancient origin of dioecy in poplars (Populus) // Molecular ecology. 2015. V. 24, N. 13. P. 3243-3256.
3. Paolucci I. et al. Genetic linkage maps of Populus alba L. and comparative mapping analysis of sex determination across Populus species // Tree Genetics & Genomes. 2010. V. 6, N. 6. P. 863-875.
4. Zhou R. et al. Sequencing and Analysis of the Sex Determination Region of *Populus trichocarpa* // Genes. 2020. V. 11. P. 843.
5. Müller N.A. et al. A single gene underlies the dynamic evolution of poplar sex determination // Nature Plants. 2020. P. 1-8.

Получение полноразмерного функционального никотинового рецептора типа $\alpha 7$ в клетках HEK293

*И.Д. Кукушкин^{1,2}, М.Л. Бычков², М.А. Шулепко², А.О. Евдокимова^{1,2}, О.В. Шлепова^{1,2},
Е.Н. Люкманова^{1,2}*

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

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

Никотиновый рецептор ацетилхолина типа $\alpha 7$ -nAChR является пентамерным лиганд-зависимым ионным каналом, который экспрессируется во всех отделах мозга, усиливает выброс глутамата, модулирует процессы долговременной потенциации и депрессии в гиппокампе, увеличивает количество и плотность синапсов, а также подавляет воспалительные процессы в мозге [1], играя тем самым важную роль в когнитивных процессах и мышлении. Многие психические и неврологические заболевания, а также процесс старения организма характеризуются значительным ухудшением когнитивных функций, что часто связано с изменениями в работе ионных каналов, в том числе и $\alpha 7$ -nAChR [1]. Перспективным способом лечения заболеваний, связанных с дисфункцией $\alpha 7$ -nAChR, может быть создание биомедицинских препаратов направленного действия, имитирующих свойства природных лигандов (агонистов или антагонистов), однако, для успешного рационального дизайна на их основе новых лекарственных препаратов необходимы знания о пространственной структуре $\alpha 7$ -nAChR. Все данные о структуре рецептора в настоящий момент получены с использованием модельных химерных белков, содержащих участки внеклеточного домена $\alpha 7$ -nAChR и ацетилхолин-связывающего белка моллюска *Lymnaea stagnalis*. Получение пространственной структуры полноразмерного функционального $\alpha 7$ -nAChR является важной задачей современной структурной биологии и фармакологии.

В рамках данной работы разработана система экспрессии полноразмерного функционального $\alpha 7$ -nAChR в клетках эукариот. Для этого использовалась транзientная трансфекция клеток линии HEK293-GnTi-(S) плазмидой pLVT/ $\alpha 7$ -nAChR и плазмидой, кодирующей ген шаперона $\alpha 7$ -nAChR NACHO (pVAX/NACHO), при помощи которого происходит встраивание $\alpha 7$ -nAChR в мембрану и сборка функционального пентамера рецептора [2]. Клетки HEK293-GnTi-(S) с выключенной экспрессией N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, в которых к белкам не присоединяются N-гликаны, использовались в связи с тем, что гликозилирование белка является нежелательным при структурных исследованиях.

Мы показали, что наиболее подходящими средами для наработки $\alpha 7$ -nAChR является среда DMEM с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (ПанЭко) и бессывороточная среда ESF SFM (Expression Systems). Следует отметить, что в бессывороточной среде ESF SFM клетки HEK293-GnTi-(S) росли медленнее в среднем на $\sim 25\%$ (Рис. 1А). Также была выявлена оптимальная плотность клеток для трансфекции, составившая 1 млн клеток в 1 мл питательной среды (Рис. 1Б). При данной плотности количество клеток удваивается в среднем за 24 часа, и культура может прожить в течение 72 часов без пересева.

При помощи проточной цитофлуориметрии с флуоресцентно-меченным α -бунгаротоксином (специфическим лигандом функционального $\alpha 7$ -nAChR) было показано, что наибольшая экспрессия функционального $\alpha 7$ -nAChR на поверхности клеток происходит через 48 часов после ко-трансфекции клеток HEK293 плазмидами pLVT/ $\alpha 7$ -nAChR и pVAX1/NACHO в молярном соотношении 1 к 3 (Рис. 1В).

Конфокальная микроскопия с флуоресцентно-меченным α -бунгаротоксином выявила, что в норме клетки HEK293-GnTi-(S) не экспрессируют функциональный $\alpha 7$ -nAChR. Однако, через 48 часов после трансфекции клеток плазмидами, кодирующей кодирующими $\alpha 7$ -nAChR и NACHO, наблюдалось значимое накопление функционального $\alpha 7$ -nAChR рецептора на поверхности клеточной мембраны (Рис. 1Г).

Был разработан протокол очистки $\alpha 7$ -nAChR из клеток HEK293-GnTi-(S). Для этого клетки лизировали при помощи ультразвука, рецептор солибилизировали в детергенте DDM и очищали с

помощью аффинной хроматографии при помощи смолы, конъюгированной с анти-FLAG моноклональными антителами (Рис. 1Д). Дополнительную очистку и выделение пентамерной фракции рецептора осуществляли с помощью гель-фильтрации. Чистоту полученного препарата проверяли при помощи Вестерн-блоттинга (Рис. 1Е).

Таким образом, впервые в клетках эукариот получен полноразмерный $\alpha 7$ -nAChR для дальнейших структурно-функциональных исследований.

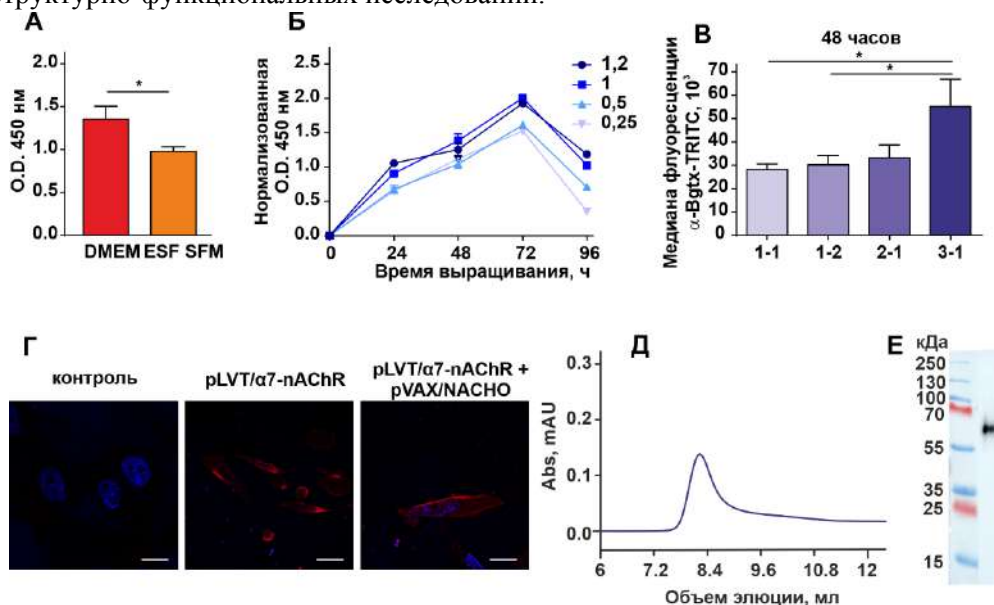


Рис.1. Получение полноразмерного $\alpha 7$ -nAChR в клетках HEK293-GnTi-(S).

А. Клетки HEK293-GnTi-(S) культивировали в среде DMEM и ESF SFM в течение 24 часов и определяли жизнеспособность клеток МТТ тестом. Данные приведены как оптическая плотность лунок планшета $\pm$ среднеквадратичная ошибка ($n=3$). * ($p<0,05$) означает достоверное отличие между группами данных и контролем согласно двустороннему t-тесту. Б. Клетки HEK293-GnTi-(S) культивировали в среде ESF SFM при различных плотностях в течение различных промежутков времени и определяли жизнеспособность клеток МТТ тестом. Данные приведены как оптическая плотность лунок планшета $\pm$ среднеквадратичная ошибка ($n=3$). В. Клетки трансфицировали при помощи реагента PanFect A plus и выращивали в течение 48 часов, после чего присутствие функциональных $\alpha 7$ -nAChR определяли с помощью флуоресцентно-меченного α -бунгаротоксина. Данные приведены как медиана флуоресценции α -бунгаротоксина $\pm$ среднеквадратичная ошибка ($n=6$). * ($p<0,05$) означает достоверное отличие между группами данных согласно One-way ANOVA с последующим Tukey's тестом. Г. Клетки окрашивали флуоресцентно-меченным α -бунгаротоксином через 48 часов после трансфекции плазмидой pLVT/ $\alpha 7$ -nAChR, либо плазмидами pLVT/ $\alpha 7$ -nAChR и pVAX1/NACHO в молярном соотношении 1 к 3. Шкала = 10 мкм. Д. Характеризация препарата $\alpha 7$ -nAChR, очищенного на смоле, конъюгированной с анти-FLAG моноклональными антителами (Tricorn 10x300, 0.6 мл/мин.). Е. Анализ препарата $\alpha 7$ -nAChR посредством Вестерн-блоттинга (антитела на His-tag).

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-74-20163.

Литература

1. Koukoulis F., Maskos U. The multiple roles of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in modulating glutamatergic systems in the normal and diseased nervous system // *Biochemical Pharmacology*. 2015. V. 97. № 4. P. 378–387.
2. Gu S., Matta J.A., Lord B., Harrington A.W., Sutton S.W., Davini W.B., Bredt D.S. Brain $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO // *Neuron*. 2016. V. 89. № 5. P. 948–955.

Системы DGR в антивирусном иммунитете бактерий

А.А. Соколов^{1,2}, И.Ш. Белалов^{1,3}, А.В. Летаров^{1,4}

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН

²МГТУ им. Н.Э. Баумана

³Механико-математический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

⁴Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Системы DGR (Diversity-generating retroelements) представляют из себя уникальное семейство генетических ретроэлементов, которые используют обратную транскрипцию для создания большого числа вариантов аминокислотных последовательностей в определенных участках генов специфических белков-мишеней. Полученное множество вариантов белка позволяет быстро адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды [1,2]. Впервые DGR был обнаружен у фага BPP-1 бактерии *Bordetella* [3], у которого он опосредует вариативность связывания вирусного рецептор-связывающего белка с различными структурами на поверхности клетки хозяина.

DGR бактериофага BPP-1 состоит из гена обратной транскриптазы (*Brt*, bacterial reverse transcriptase), шаблонного повтора (TR, template repeat), варибельного повтора (VR, variable repeat) на конце целевого гена *mtd* (major tropism determinant) и дополнительного гена, способствующего переключению тропизма. Обратная транскрипция мРНК TR, опосредованная геном *Brt*, является ключевым процессом аденин-специфического мутагенеза (замена А на N), в ходе которого создается первичная генетическая вариативность. Затем кДНК TR интегрируется в гомологичную область VR, что приводит к изменению последовательности участка гена-мишени и увеличению разнообразия его аллельных вариантов в популяции бактериофага.

Выдвинуто предположение, что DGR системы могут использоваться некоторыми бактериями в качестве основы системы приобретенного антифагового иммунитета в некотором смысле аналогично соматической гипермутации в генах антител млекопитающих.

Для проверки гипотезы о связи DGR с иммунитетом бактерий использованы данные о 948 уникальных DGR в геномах бактерий [4], представленных в NCBI GenBank [5]. Первым этапом в исследовании стал отбор генов – элементов потенциальных DGR (RT, TR, VR). Для этого использован протокол ICITY [6], разработанный для поиска генов, связанных с входным набором гомологичных белков в геномах прокариот, с учетом геномного контекста. Данный пайплайн применен к гену RT и генам, содержащим TR и VR по отдельности. Параметры пайплана выбраны согласно рекомендациям разработчиков [6]. По итогам данного этапа получены данные о всех белках, потенциально функционально связанных с компонентами DGR систем, и соответствующие им значения скоринговой функции (icity score). Значения icity score варьируются от 0 до 1, где числа, близкие к 0, указывают на слабую связь с исследуемыми белками, а числа, близкие к 1, указывают на сильную связь. Из 893 ненулевых значений icity для дальнейшего анализа отобраны белки, имеющие хотя бы по одной графе icity (RT, TR, VR) score ≥ 0.6 . Таких белков оказалось 448, причем 43% белков имеют по каждой графе значение icity ≥ 0.8 .

Вторым этапом стала филогенетическая кластеризация отобранных белковых последовательностей. В результате получено 26 кластеров, содержащих 266 белков. Белки, не вошедшие ни в один кластер (182 белка), из дальнейшего анализа исключались.

Третий этап работы — анализ полученных белков. Известно, что различные системы бактериального иммунитета в геномах часто находятся в составе так называемых иммунных островков [7]. Рассмотрены данные о 780 уникальных белковых семействах (pfam, COG) с предсказанными антифаговыми иммунными функциями [7]. Эти pfam и COG использованы как база данных для RPS-BLAST белков из предыдущего этапа. В результате данного этапа получено 7 уникальных белков.

Заключительным этапом стал анализ VR содержащих белков. Для этого аналогично двум предыдущим этапам проведена кластеризация данных белков, а также запущен RPS-BLAST на той же базе, что и на предыдущем шаге. В результате получены данные о 15 уникальных белках (из 40 всего по результатам RPS-BLAST).

Таким образом, для экспериментальной проверки в лаборатории отобраны 15 VR-содержащих белков и 7 белков, функционально взаимодействующих с DGR, с высокой вероятностью одновременно задействованных в антифаговом иммунитете бактерий.

Полученные данные дают основание полагать о наличии у некоторых бактерий ранее не изученной системы приобретённого противовирусного иммунитета, что впоследствии может быть

использовано в различных областях биотехнологии, а также генной инженерии аналогично системам CRISPR-Cas.

Литература

1. Medhekar B. and Miller J.F. (2007) Diversity-generating retroelements. *Curr. Opin. Microbiol.*, 10, 388–395.
2. Guo H., Arambula D., Ghosh P. and Miller J.F. (2014) Diversity-generating retroelements in phage and bacterial genomes. *Microbiol. Spectr.*, 2, doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0029-2014.
3. Liu M., Deora R., Doulatov S.R., Gingery M., Eiserling F. A., Preston A., Maskell D.J., Simons R.W., Cotter P.A., Parkhill J. and Miller J.F. (2002). Reverse transcriptase-mediated tropism switching in *Bordetella* bacteriophage. *Science* 295, 2091–2094.
4. Yan F., Yu X., Duan Z., Lu J., Jia B., Qiao Y., Sun C., Wei C. Discovery and characterization of the evolution, variation and functions of diversity-generating retroelements using thousands of genomes and metagenomes. *BMC Genomics*. 2019 Jul 19;20(1):595. doi: 10.1186/s12864-019-5951-3.
5. Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D67-D72. doi:10.1093/nar/gkv1276.
6. Shmakov S.A., Faure G., Makarova K.S., Wolf Y.I., Severinov K.V., Koonin E.V. Systematic prediction of functionally linked genes in bacterial and archaeal genomes. *Nat Protoc.* 2019 Oct;14(10):3013-3031. doi: 10.1038/s41596-019-0211-1.
7. Doron S., Melamed S., Ofir G., Leavitt A., Lopatina A., Keren M., Amitai G., Sorek R. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*. 2018 Mar 2;359(6379):eaar4120. doi: 10.1126/science.aar4120.

УДК 578.282

Стабильность бактериофагов в сыворотке крови

А.Д. Ефимов¹, В.И. Богдан^{1,2}, А.К. Голомидова¹, А.В. Летаров^{1,2}

¹Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского
ФИЦ Биотехнологии РАН

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

В сложившихся условиях, широкое распространение резистентности к антибиотикам у патогенных бактерий — одна из наиболее актуальных проблем современной медицины, рассматриваемая ВОЗ в качестве глобального вызова [1]. Перспективный подход к решению этой проблемы — применение бактериофагов в качестве агентов антибактериальной терапии [2].

В Российской Федерации и в некоторых других странах производятся и с успехом используются фаговые препараты для местного применения [3]. Однако системное применение фаговых препаратов ограничено, особенно при парентеральном способе введения, что осложняет терапию эндосоматических инфекций. Фармакокинетика бактериофаговых препаратов при парентеральном введении, на сегодняшний день, остается не до конца изученной. По литературным данным, система комплемента сыворотки крови способна нейтрализовывать фаговые частицы [4]. Исследование этого факта стало нашей первой ступенью к изучению потенциального влияния макроорганизма на фаги.

Для анализа антифаговой активности сыворотки крови использовалась свежая сыворотка крови модельных животных — кролика и лошади. Часть сыворотки была инактивирована (59°C, 15 мин). Для исследований были выбраны бактериофаги: DT57C (NC_027356), G7C (NC_015933), PhiKT (NC_019520), Vir1. Титрование бактериофагов по Грациа производили на 2-х штаммах *E. coli*: штамм 4s для G7C, DT57C, phiKT и уropатогенный штамм up11 для Vir1 (коллекция лабораторий вирусов микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН). Выбранные бактериофаги отличались по таксономии, морфологии и источнику открытия. В эксперименте использовали очищенные фаговые препараты, для получения которых лизаты вышеперечисленных фагов фильтровали через мембрану с диаметром пор 0.22 мкм, концентрировали центрифугированием при 75'000 g и очищали в градиенте плотности CsCl для удаления эндотоксина [5]. Препараты освобождали от CsCl диализом в SM буфере. Одинаковые аликвоты каждого лизата известного разведения смешивали с сывороткой (1:1) и инкубировали в термостате при 37°C. Пробы для титрования отбирали на 10, 30, 60, 120, 240, и

360 минуте. В качестве контроля были использованы физиологический раствор и сыворотка инактивированная прогреванием (при 59 °С в течение 15 мин.).

В этих условиях падение титра фагов не превышало одного порядка (Рис 1-5) даже после 6 ч. инкубации с сывороткой. Существенных различий между интактной сывороткой и сывороткой, инактивированной прогреванием не было обнаружено.

Наши результаты противоречат наблюдением польских исследователей [4] и свидетельствуют об отсутствии существенного вклада системы комплемента в инактивацию бактериофагов в сыворотке крови, не содержащей антител против соответствующих вирусов.

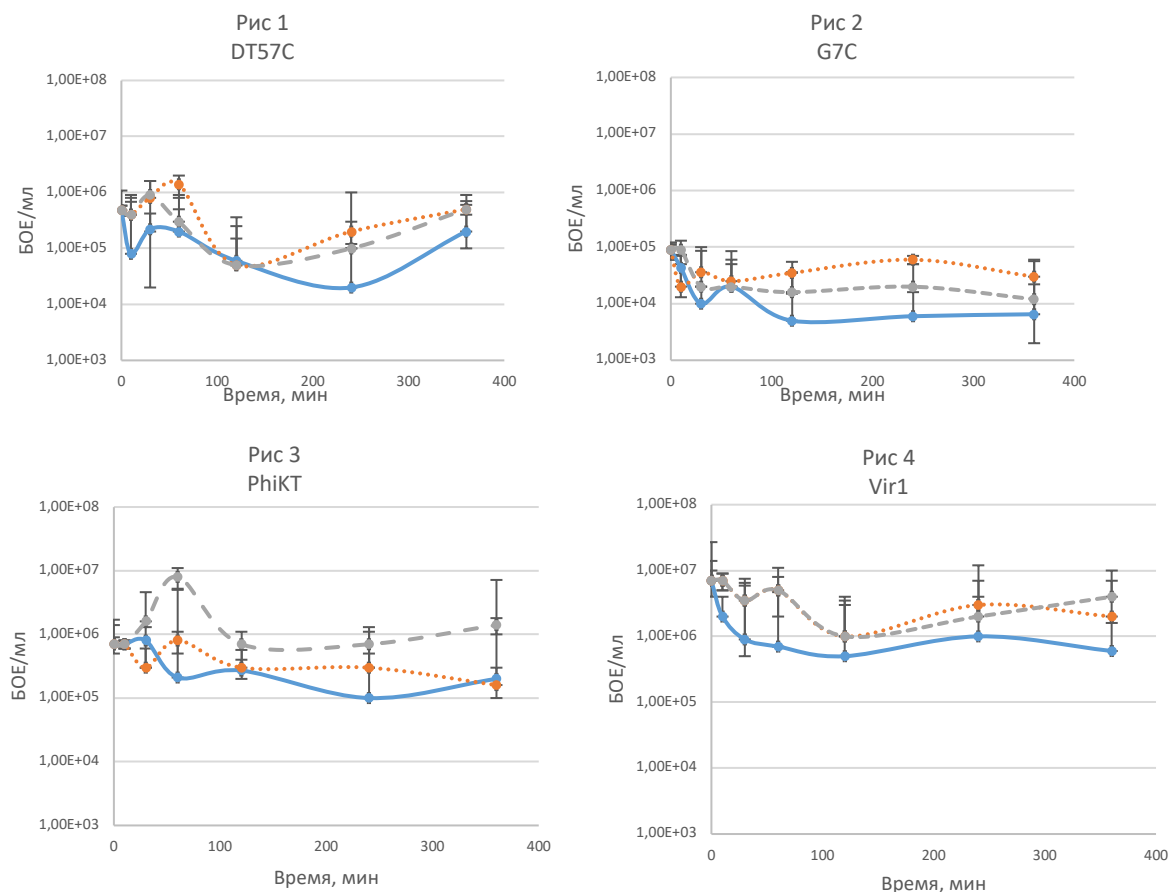


Рис. 1-4. Изменение титра бактериофагов с течением времени при инкубации в сыворотке крови кролика, инактивированной сыворотке крови кролика (инс), физиологическом растворе (контроль). Условные обозначения для всех 4-х графиков расположены в рамке справа

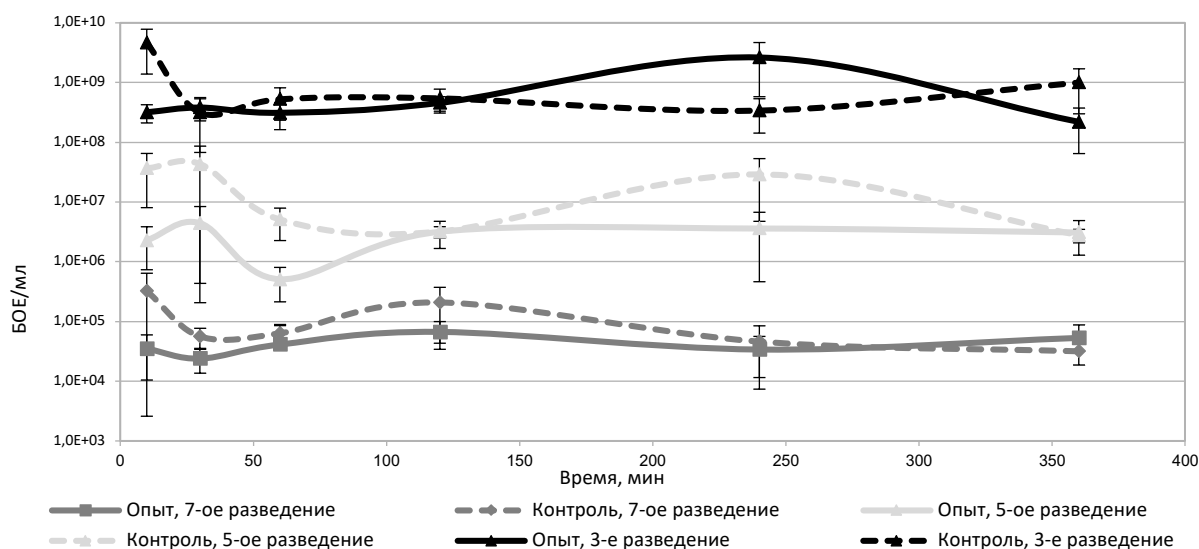


Рис 5 Изменение титра бактериофага DT57C с течением времени при инкубации в сыворотке крови лошади (опыт), физиологическом растворе (контроль). Изначальный титр бактериофага равнялся $1 \cdot 10^{11}$ БОЕ/мл.

Литература

1. Altamirano F. L. G., Barr J. J. Phage therapy in the postantibiotic era //Clinical microbiology reviews. – 2019. – V. 32. – №. 2.
2. Rodriguez-Gonzalez R. A. et al. Quantitative Models of Phage-Antibiotic Combination Therapy //Msystems. – 2020. – V. 5. – №. 1.
3. Wright A. et al. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy //Clinical otolaryngology. – 2009. – V. 34. – №. 4. – P. 349-357.
4. Hodyra-Stefaniak K. et al. Bacteriophages engineered to display foreign peptides may become short-circulating phages //Microbial biotechnology. – 2019. – V. 12. – №. 4. – P. 730-741.
5. Morrison D. C., Leive L. Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111: B4 prepared by two extraction procedures //Journal of Biological Chemistry. – 1975. – V. 250. – №. 8. – P. 2911-2919.

УДК 575.224.22

Филогенетический анализ компенсированных болезнетворных мутаций у человека

В.С. Новикова^{1,2}, В.Е. Раменский², М. Зайченко^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

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

Компенсированная болезнетворная замена - это болезнетворный для человека аллель, наблюдаемый у ортологов близких видов в качестве дикого типа [1]. Значимость описанного явления заключается в том, что при интерпретации эффекта замены её наличие у относительно близких видов является аргументом в пользу безвредности данной замены. Однако в ряде случаев (до 10%) это не является истиной, так как болезнетворная для человека замена всё же фиксируется у ортологов. Предположительно у данных видов в этих же белках происходит иная (интрагенная) замена, компенсирующая эффект исходной. Подобный механизм также типичен и для патогенов, вырабатывающих устойчивость к лекарственным препаратам или иммунной системе человека [2; 3].

Целью данной работы является исследование филогенетических свойств компенсированных болезнетворных вариантов у человека, направленное на поиск потенциальных компенсирующих замен. Разработанные методы могут способствовать более детальному изучению молекулярной эволюции, благодаря чему можно понять, механизм возникновения и развития функции различных белков.

Был произведён анализ несинонимичных замен с различной клинической значимостью, описанных в базе ClinVar [4], таких, что второй аллель замены наблюдается в норме у ортологов 26 секвенированных приматов. Общее число таких замен составило 325 болезнетворных для человека, 4,759 нейтральных, а также 12,902 замен с неопределённой значимостью и 1,734 замен с противоречащими интерпретациями. В ходе исследования была разработана методика филогенетического анализа событий, связанных с закреплением или потерей болезнетворного аллеля.

Было произведено сравнение физико-химических свойств замен в белках человека с различной клинической значимостью с помощью матриц BLOSUM62 и Grantham. Показано, что спектры безвредных и болезнетворных замен в изученных выборках различаются с точки зрения изменения физико-химических свойств аминокислот, что в дальнейшем может быть использовано для предсказания компенсированных болезнетворных мутаций (рис. 1).

С помощью PAML (Phylogenetic Analysis Using Maximum Likelihood) [5] и дальнейшей обработки на языке программирования Python3 была получена статистика встречаемости следующих эволюционных сценариев:

1) Аллель AA2 (вариант аминокислоты, возникающий в результате замены у человека и наблюдаемый в норме у одного или более приматов) является предковым, а замена вида AA2 →

AA1 (вариант аминокислоты, наблюдающийся в норме у человека) произошла «по дороге» к человеку. В этом случае можно ожидать, что после замены AA2 → AA1 произошла потеря предкового компенсирующего аллеля в другом сайте того же белка, в результате чего AA2 становится болезнетворным [6].

2) Простой случай однократного происхождения AA2: аллель AA1 является предковым, замена AA1 → AA2 произошла только один раз в ветке, ведущей к какой-либо группе приматов.

3) Случай независимого многократного происхождения мутаций: аллель AA1 является предковым, замена вида AA1 → AA2 произошла более одного раза в ветках, ведущих к различным группам приматов или к отдельным видам.

4) Случай последовательных замен: аллель AA1 является предковым, однако произошло две последовательных замены: AA1 → AA2 → AA1. При этом аллель AA2 будет наблюдаться у несвязной с точки зрения топологии дерева группы приматов.

В таблице 1 представлено количество и доля случаев, соответствующее каждому из четырёх описанных выше сценариев, для каждой категории вариантов.

Наблюдаемые частоты различных сценариев и их отличия между категориями замен с различной клинической значимостью подтверждают гипотезу о возможной внутригенной компенсации в случае болезнетворных аллелей и ее отсутствии в случае безвредных замен. Следующим этапом работы будет анализ найденных пар "исходная замена - компенсатор" с точки зрения типов замен, локализации в структуре белка и влияния на стабильность белка.

Проект поддерживается грантом РФФИ № 20-54-12008

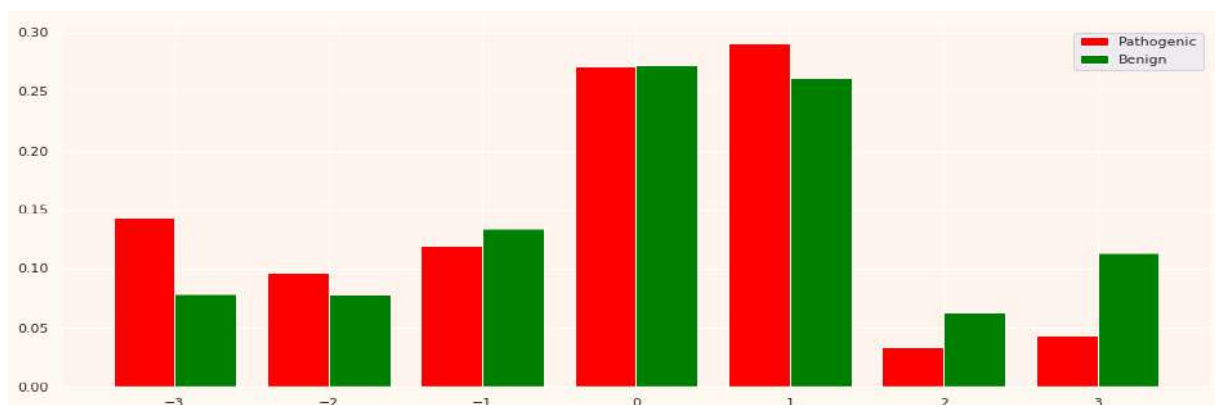


Рис. 1. Частота встречаемости элемента матрицы BLOSUM62 в выборке болезнетворных и безвредных замен. По оси абсцисс представлены элементы матрицы BLOSUM62, встречающиеся в данных выборках, по оси ординат представлена нормированная частота встречаемости данных элементов в каждой выборке. Красным цветом представлены результаты для болезнетворных (Pathogenic), зелёным - для нейтральных (Benign).

	Предковый аллель AA2	Однократная замена AA1 → AA2	Многократная замена AA1 → AA2	Последовательные замены AA1 → AA2 AA2 → AA1	Неизвестные случаи	Всего
Pathogenic	33 (10,1%)	224 (68,9%)	27 (8,3%)	36 (11,1%)	5 (1,5%)	325 (100%)
Benign	1,548 (32,5%)	1,745 (36,7%)	647 (13,6%)	808 (17,0%)	11 (0,2%)	4,759 (100%)
Uncertain significance	2,124 (16,5%)	7,229 (56,0%)	1,916 (14,8%)	1,362 (10,6%)	271 (2,1%)	12,902 (100%)
Conflicting interpretations	438 (25,3%)	773 (44,6%)	275 (15,9%)	245 (14,1%)	3 (0,2%)	1,734 (100%)

Таб. 1. количество и процентное соотношение мутаций разных групп, соответствующих определённым эволюционным сценариям.

Литература

1. Kondrashov, A.S., Sunyaev, S., and Kondrashov, F.A. (2002). Dobzhansky-Muller incompatibilities in protein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99, 14878–14883.
2. Kern A.D., Kondrashov F.A. (2004) Mechanisms and convergence of compensatory evolution in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nat Genet*; 36:1207–1212.
3. Baresić, A., Hopcroft, L.E.M., Rogers, H.H., Hurst, J.M., and Martin, A.C.R. (2010). Compensated pathogenic deviations: analysis of structural effects. *J. Mol. Biol.* 396, 19–30.
4. Landrum M.J., et al. (2016) ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D862-8. doi: 10.1093/nar/gkv122.
5. Yang, Z. 2007. PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1586–1591 (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>)
6. Jordan, D.M., et al. (2015). Identification of cis-suppression of human disease mutations by comparative genomics. *Nature* 524, 225–229.

УДК 577.2

Функциональная аннотация протеоформ человека, образованных в результате альтернативного сплайсинга, путем анализа интерактомной карты, построенной на основе AP-MS данных

А. А. Романова^{1,2}, О. И. Киселева², М. А. Пятницкий², Е. В. Поверенная²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский институт)

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

Многообразие функций белков обеспечивается их строением, составом и свойствами [1, 2]. Разные виды белков (протеоформы), кодируемые одним геном, зачастую обладают разными функциями [3]. Для выявления функции белков активно используются интерактомные данные, где согласно принципу «guilt-by-association» белок-белковые взаимодействия (ББВ) позволяют оценить схожесть участия в клеточных процессах белков с неизвестной функцией с функционально аннотированными белками [4]. Один из популярных методов выявления ББВ - аффинная очистка в сочетании с масс-спектрометрией (affinity purification with mass spectrometry, AP-MS) [5], преимуществом которого является нативное отображение протеомного состава внутри клеточных процессов.

Для построения карты ББВ были использованы AP-MS данные из базы данных BioPlex 2.0 [6], содержащая более 11,532 экспериментов. Исходные масс-спектрометрические данные были обработаны тремя поисковыми системами (X!Tandem, MS-GF+, OMSSA) [7], входящими в состав пакета SearchGUI (V.3.3.15) в сочетании с PeptideShaker (V. 1.16.40) [8] согласно критериям, рекомендованным международным протеомным сообществом [9]. На основе полученных результатов была построена карта ББВ путем интерпретации белок-белковых взаимодействий с помощью матричной модели, в которой все белки, встречающиеся в одном эксперименте по очистке (пары «наживка»-«добыча», «добыча»-«добыча»), распознаются как связанные друг с другом. [10]

Полученная карта ББВ состояла из 9967 вершин (белков), связанных 287 474 взаимодействиями с 8686 белками, среди которых 1026 было представлено сплайс-формами. Каждый белок в среднем взаимодействовал с 5 партнерами.

Прогнозирование функции белков выполнялось с помощью нейронного алгоритма COSNet, основанного на нейронной сети Хопфилда для изучения узлов частично помеченных графов [11]. В качестве обучающей выборки использовались отобранные случайным образом 80% белков, аннотированные в Gene Ontology [12], оставшиеся 20% белков составляли тестовую выборку.

В результате было обнаружено различия в функциях от канонической формы для 31 сплайс-форм. Кроме того, были предсказаны функции для 387 ранее не аннотированных белков [13].

Литература

1. Aebersold R., Agar J.N., Amster I.J., Baker M.S., Bertozzi C.R., Boja E.S., Costello C.E., Cravatt B.F., Fenselau C., Garcia B.A., [et al.] How many human proteoforms are there? // *Nature Methods*. 2018. V. 14. P. 206–214.

2. Ponomarenko E.A., Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Pyatnitskiy M.A., Kopylov A., Zgoda V.G., Lisitsa A.V., Archakov A. The Size of the Human Proteome: The Width and Depth. // Int J Anal Chem. 2016. V. 2016. P. 1–6.
3. Yang X., Coulombe-Huntington J., Kang S., Sheynkman G.M., Hao T., Richardson A., Sun S., Yang F., Shen Y.A., Murray R.R., [et al.] Widespread Expansion of Protein Interaction Capabilities by Alternative Splicing. // Cell. 2016. V. 164. P. 805–817.
4. Kulmanov M., Khan M.A., Hoehndorf R. DeepGO: Predicting protein functions from sequence and interactions using a deep ontology-aware classifier. // Bioinformatics. 2017. V. 34. P. 660–668.
5. Morris J.H., Knudsen G.M., Verschuere E., Johnson J.R., Cimermancic P., Greninger A.L., Pico A.R. Affinity purification–mass spectrometry and network analysis to understand protein–protein interactions. // Nat Protoc. 2014. V. 9. P. 2539–2554.
6. Huttlin E.L., Bruckner R.J., Paulo J.A., Cannon J.R., Ting L., Baltier K., Colby G., Gebreab F., Gygi M.P., Parzen H., [et al.] Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. // Nature. 2017. V. 545. P. 505–509.
7. Kiseleva O., Poverennaya E., Shargunov A., Lisitsa A. Proteomic Cinderella: Customized analysis of bulky MS/MS data in one night. // Journal of Bioinformatics and Computational Biology. 2018. V. 16(1). P. 1740011.
8. Barsnes H., Vaudel M. SearchGUI: A Highly Adaptable Common Interface for Proteomics Search and de Novo Engines. // J Proteome Res. 2018. V. 17. P. 2552–2555.
9. Mellacheruvu D., Wright Z., Couzens A.L., Lambert J.-P., St-Denis N.A., Li T., Miteva Y.V., Hauri S., Sardiu M.E., Low T.Y., [et al.] The CRAPome: A contaminant repository for affinity purification–mass spectrometry data. // Nat. Methods. 2013. V. 10. P. 730–736.
10. He Z. PPI network inference from AP-MS data. // Data Min Bioinform Appl. 2015. V. 16. P. 51–59.
11. Frasca M., Berton A., Re M., Valentini G. A neural network algorithm for semi-supervised node label learning from unbalanced data. // Neural Netw. 2013. V. 43. P. 84–98.
12. Brionne A., Juanchich A., Hennequet-Antier C. ViSEAGO: A Bioconductor package for clustering biological functions using Gene Ontology and semantic similarity. // Biodata Min. 2019, 12, 13–16.
13. Ekaterina Poverennaya, Olga Kiseleva, Anastasia Romanova and Mikhail Pyatnitskiy Predicting Functions of Uncharacterized Human Proteins: From Canonical to Proteoforms. // Genes. 2020. V. 11(6). P. 677.

УДК 579.61

Характеристика биологических свойств и особенностей организации генома бактериофага, специфически инфицирующего *Acinetobacter baumannii* капсульный тип 47

А.С. Щурова¹, М.М. Шнейдер², А.В. Попова^{1,3}

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

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

³ ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии

Acinetobacter baumannii, представитель группы неферментирующих грамотрицательных аэробных бактерий, является одним наиболее значимых возбудителей внутрибольничных инфекций во всем мире. Клинически значимыми особенностями *A. baumannii* являются устойчивость к подавляющему большинству антибиотиков, толерантность к дезинфицирующим средствам, детергентам, высушиванию и ультрафиолетовому облучению, а также способностью к образованию биопленок на различных поверхностях. *A. baumannii* часто становится причиной развития госпитальных пневмоний, раневых инфекций, постхирургических осложнений и инфекций кровотока, представляя наибольшую опасность для пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии [1, 2]. К настоящему времени на основании анализа геномных последовательностей различных штаммов *A. baumannii* идентифицировано 128 вариантов генных локусов, кодирующих белки синтеза капсульных полисахаридов (КПС), формирующих толстый защитный слой вокруг бактериальных клеток [3]. КПС являются первичными рецепторами для бактериофагов, в геномах которых закодированы рецептор-связывающие белки с полисахарид-деполимеризующей активностью или высокоспецифичные структурные деполимеразы, ответственные за расщепление КПС в процессе инфицирования и прикрепления к бактериальной клетке-хозяину [4–6].

Одним из возможных подходов для решения проблемы распространения антибиотикоустойчивых штаммов *A. baumannii* разных капсульных типов является использование специфических литических бактериальных вирусов или бактериофагов.

В данной работе представлена характеристика биологических свойств и особенностей организации генома бактериофага, специфически инфицирующего капсульный тип 47 *A. baumannii*.

На культуре чувствительного штамма-хозяина *A. baumannii* NIPH601 (капсульный тип 47), бактериофаг формирует мелкие прозрачные негативные колонии, окружённые зоной полупрозрачного ореола.

В системе бактериофаг-бактериальная клетка *A. baumannii* NIPH601 определены параметры инфекционного процесса: скорость адсорбции, латентный период и выход фаговых частиц. Показано, что 70 % фаговых частиц адсорбируются в течение 5 мин. Длительность латентного периода составляет 40 минут, выход фаговых частиц – около 20 на одну инфицированную бактериальную клетку.

В ходе работы проведен биоинформатический анализ и функциональная аннотация фагового генома. Выявлено 178 открытых рамок считывания (ОРС), кодирующих предполагаемые пептиды, из которых 111 ОРС располагаются на прямой, 67 – на обратной цепях ДНК. При сравнении аминокислотных последовательностей потенциальных белков фага с известными протеинами, определены возможные функции 21,9 % (39 из 178) из них; 53,9 % (96 из 178) ОРС кодируют гипотетические белки с неизвестными функциями, представленные в базах данных; 24,1 % (43 из 178) ОРС не имеют сходства с какими-либо фаговыми или бактериальными протеинами.

Установлено, что геном бактериофага имеет модульную организацию и включает гены, кодирующие продукты, которые участвуют в упаковке фаговой ДНК (портальный протеин и терминазы); структурные протеины (белки капсида, хвостового отростка, базальной пластинки и структурных деполимераз); белки, ответственные за лизис бактериальной клетки-хозяина (холин, эндолизин), продукты, отвечающие за нуклеотидный обмен, транскрипцию и репликацию фаговой ДНК (ДНК полимеразы, РНК полимеразы, пирофосфогидролаза, 5'-3' экзонуклеаза, ДНК праймаза и др.).

Следует отметить, что в геноме фага не идентифицировано генов, кодирующих токсины или какие-либо известные факторы вирулентности, а также генов, определяющих умеренный (лизогенный) путь развития.

Учитывая специфичность действия и литическую природу исследуемого бактериофага, обсуждается возможность его использования как антибактериального агента для контроля распространения соответствующего капсульного типа *A. baumannii*.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 20-75-10113)

Литература

1. A. Y. Peleg, H. Seifert, D. L. Paterson. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen // Clin. Microbiol. Rev. 2008. Vol. 21. N 3. P. 538-582.
2. Christian M. Harding, Seth W. Hennon, Mario F. Feldman. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence // Nat. Rev. Microbiol. 2018. Vol. 16. p. 91-102. doi:10.1038/nrmicro.2017.148
3. N. P. Arbatsky, A. A. Kasimova, A. S. Shashkov, M. M. Shneider, A. V. Popova, D. A. Shagin, A. A. Shelenkov, Y. V. Mikhailova, Y. G. Yanushevich, I. S. Azizov, M. V. Edelstein, R. M. Hall, J. J. Kenyon, Y. A. Knirel Structure of the K128 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* KZ-1093 from Kazakhstan // Carbohydr Res. 2019. Vol. 485:107814. doi: 10.1016/j.carres.2019.107814
4. I.M. Lee, I.F. Tu, F.L. Yang, T.P. Ko, J.H. Liao, N.T. Lin, C.Y. Wu, C.T. Ren, A.H. Wang, C.M. Chang, K.F. Huang, S.H. Wu. Structural basis for fragmenting the exopolysaccharide of *Acinetobacter baumannii* by bacteriophage ϕ AB6 tailspike protein // Sci Rep. 2017. Vol. 7:42711. doi: 10.1038/srep42711.
5. A.V. Popova, D.G. Lavysh, E.I. Klimuk, M.V. Edelstein, A.G. Bogun, M.M. Shneider, A.E. Goncharov, S.V. Leonov, K.V. Severinov. Novel Frl-like viruses infecting *Acinetobacter baumannii* – vB_AbaP_AS11 and vB_AbaP_AS12 – characterization, comparative genomic analysis, and host-recognition strategy // Viruses. 2017. Vol. 9. pii: E188. doi: 10.3390/v9070188.
6. H. Oliveira, A.R. Costa, N. Konstantinides, A. Ferreira, E. Akturk, S. Sillankorva, A. Nemec, M. Shneider, A. Dötsch, J. Azeredo. Ability of phages to infect *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species through acquisition of different pectate lyase depolymerase domains // Environ Microbiol. 2017. Vol. 19 P. 5060-5077. doi: 10.1111/1462-2920.13970.

Секция физики живых систем

Председатель: К.И. Агладзе (к.ф.-м.н., профессор)

Зам. председателя: В.М. Заико (к. ф.-м. н., доц.)

Секретарь: В.А. Цвеляя

Дата: 26.11.2020 Время: 13:00

УДК 535.37:577.325.3

Анализ стабильности люциферазы светляков *Luciola mingrelica* при денатурации мочевиной

Д.Д. Зыкова¹,

¹Сибирский федеральный университет

Определение стабильности структуры белков является актуальной проблемой, важной как для понимания фундаментальной связи между первичной последовательностью полипептидов и их укладкой, так и для решения широкого круга прикладных задач, связанных с использованием белков в биомедицине и различных биотехнологиях. В данной работе была исследована стабильность люциферазы светляков – фермента, широко применяемого в биоаналитических системах [1], методами флуоресцентной спектроскопии с высоким разрешением.

В работе были использованы следующие реактивы: люцифераза светляков *Luciola mingrelica* («Люмтек», Россия); Tris-ацетатный буфер (50 mM, pH 7,9); растворы мочевины (Panreac) с концентрацией 1,8-7,8 М. Белок (0,2 мг/мл) инкубировали в растворах мочевины с различной концентрацией при комнатной температуре в течение не менее 18 часов, после чего проводили измерения оптических характеристик при температуре 20 °С. Для регистрации спектров поглощения использовали спектрофотометр Cary 5000 (Agilent Technologies, Australia). Спектры флуоресценции белка при стационарном возбуждении 296 нм были измерены с помощью спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba, JobinYvon, Франция). Спады флуоресценции при импульсном возбуждении были зарегистрированы методом счета одиночных фотонов с временной корреляцией с помощью модуля DeltaHub (Horiba, JobinYvon, Франция). По спадам вычисляли времена жизни флуоресценции и их амплитуды методом деконволюции с помощью специализированного приложения DAS6 (Horiba, JobinYvon, Франция).

Было получено, что спектр флуоресценции люциферазы в нативном состоянии характеризуется максимумом около 337 нм, а в ходе денатурации мочевиной сдвигается батохромно (рис. 1 А). Сдвиг спектра флуоресценции был охарактеризован зависимостью отношения интенсивностей при 320 и 360 нм (I_{320}/I_{360}) от концентрации мочевины, на основании чего был выявлен структурный переход белка в диапазоне 2,8-3,5 М мочевины с серединой при $3,13 \pm 0,02$ М (рис. 1 Б).

По время-разрешенным спадам было установлено, что флуоресценция люциферазы формируется двумя основными компонентами – с временем жизни около 6 нс (τ_1) и 2,5 нс (τ_2). В нативном состоянии белка спектр испускания, ассоциированный с τ_1 , (DAS τ_1) имеет максимум около 341 нм и вклад 51 % в общий спектр белка, в то время как DAS τ_2 сдвинут гипсохромно и характеризуется максимумом около 333 нм и вкладом 38 % (рис. 2 А). По изменению значений τ_1 и τ_2 был также выявлен один структурный переход люциферазы с серединой около 3,1 М (рис. 2 Б). Найденные середины переходов совпадают с опубликованными данными для люциферазы *Lampyrus turkestanicus* [2].

В первичной последовательности люциферазы светляков *L. mingrelica* присутствует единственный триптофановый остаток (W419), определяющий флуоресценцию этого белка при возбуждении 296 нм, использованном в данной работе. Для объяснения происхождения двух компонент времени жизни флуоресценции, полученных в ходе исследования, была проанализирована про-

странственная структура люциферазы. Было проведено вычисление молекулярной динамики структуры бактериальной люциферазы в явном растворителе с помощью программы GROMACS версии 5.1.4 [3]. Были рассчитаны двугранные углы, характеризующие конформацию боковой цепи триптофана в течение 30 нс моделирования. Результаты моделирования показали, что W419 находится в единственной конформации, характеризующейся углами χ_1 от -96° до -38° и χ_2 от 41° до 130° .

Таким образом, в результате анализа характеристик флуоресценции люциферазы *L. mingrelica* при стационарном и импульсном возбуждении определена середина структурного перехода этого белка при равновесной денатурации мочевиной ($3,1 \pm 0,1$ М). Впервые зарегистрированы времена жизни флуоресценции этого одотриптофанового белка и проанализировано их изменение в ходе денатурации.

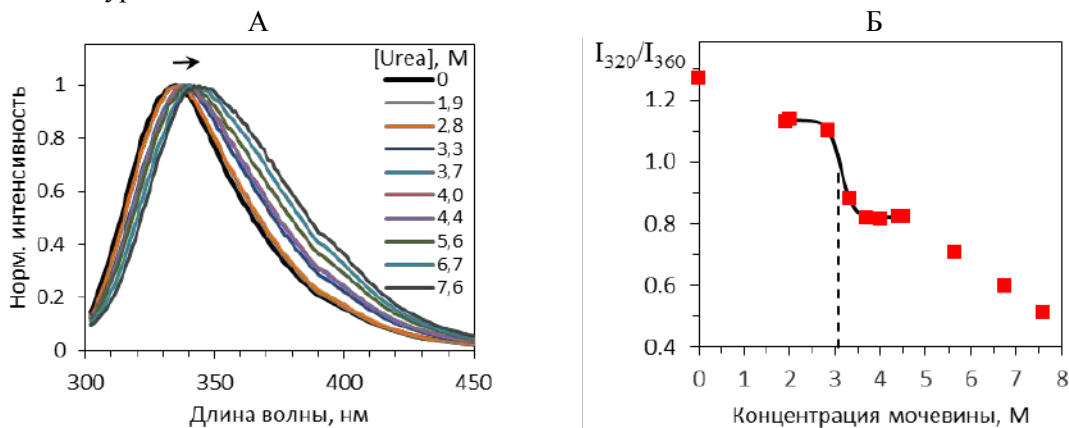


Рис. 1. Спектры флуоресценции люциферазы светлячков *L. mingrelica* после инкубации при различных концентрациях мочевины (А) и зависимость параметра I_{320}/I_{360} от концентрации мочевины (Б). Пунктирной линией обозначена середина перехода, сплошной линией – аппроксимация функцией Больцмана

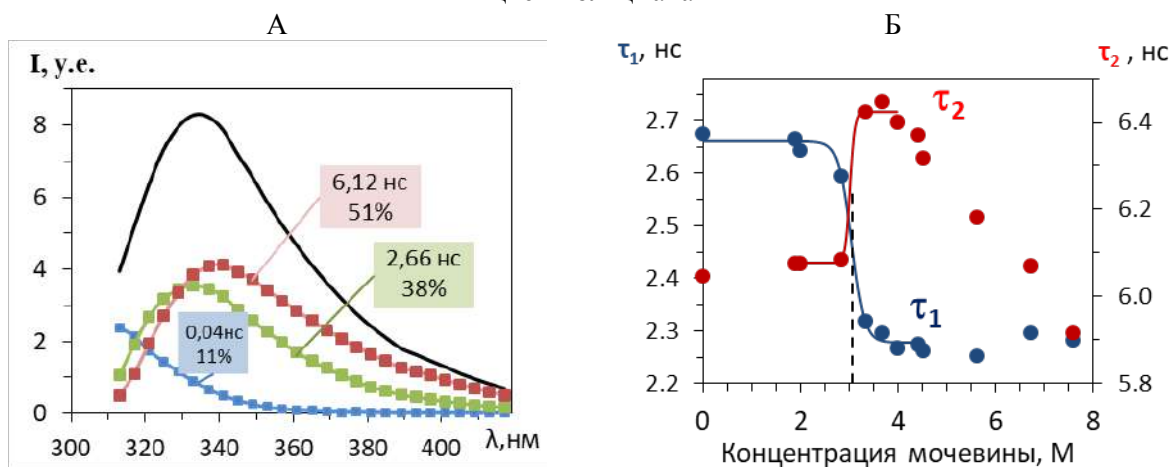


Рис. 2. Вклады компонент с разными временами жизни флуоресценции в спектр люциферазы (А) и зависимость значений компонент времени жизни от концентрации мочевины (Б). Пунктирной линией обозначена середина перехода, сплошной линией – аппроксимация функцией Больцмана

Литература

1. Kaskova, Z. M., Tsarkova, A. S., & Yampolsky, I. V. (2016). 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chemical Society Reviews*, 45(21), 6048–6077.
2. Khalifeh K. Surface Arginine Saturation Effect on Unfolding Reaction of Firefly Luciferase: A Thermodynamic and Kinetic Perspective, *Photochemistry and Photobiology – Photochemistry and Photobiology*, 2016, 92: 688–693.
3. D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess et al., *J. Comput. Chem.*, 26 (16), 1701, (2005).

Способ моделирования и классификации патологий миокарда на основе новых представлений о магнитофизике миокарда

Семенов И. А.¹, Арутюнов Ю. А.², Чащин Е. А.³

¹АНОО «Физтех-лицей» им. П.Л. Капицы

²Педагог-организатор АНОО «Физтех-лицей» им. П. Л. Капицы, г. Долгопрудный, к.ф.-м.н.

³Заведующий кафедры электротехники ковровской государственной технологической академии им. В.А. Дегтярёва

Мониторинг работы сердца и возможность своевременного обнаружения патологий в его работе считаются одними из главных задач современной медицины, поскольку заболевания сердечно-сосудистой системы являются лидирующими по распространенности среди причин смерти пациентов. Новые возможности диагностики сердечных заболеваний открывает метод магнитокардиографии, позволяющий более точно локализовать область поражения миокарда. Несколько лет назад было совершено открытие о том, что миокард имеет структуру листа Мебиуса. Это открытие дает возможность получить новые параметры миокарда, разработать классификацию патологий миокарда, используя новые представления о его анатомии.

Целью работы являлось исследование магнитофизических свойств моделей миокарда, соответствующих состояниям «норма» и «патология» для построения классификатора состояний миокарда на основе выявленных магнитофизических признаков.

Методика. В ходе исследования снимались показания с морфологически-подобной модели миокарда путем регистрации магнитного поля с модели с помощью датчика-миллигауссметра. Общее число наблюдаемых переменных в пределах каждой серии составило 391 тыс. значений), что является достаточным с точки зрения статистической обработки данных.

Модели миокарда: для проведения исследований магнитофизических характеристик миокарда были изготовлены анатомическо-морфологические модели, соответствующие новым представлениям об анатомии и морфологии миокарда. Модель миокарда выполнена из гибкого материала с параметрами: длина 60 см, ширина 8 см, толщина 1 см. В пластичную основу полосы как основы имитатора миокарда сердца в качестве наполнителя был добавлен порошок ферромагнитного материала с целью создания и имитации магнитного поля. Полученный образец был «скручен» в тор с топологией Мебиуса. Образцы моделей миокарда были созданы в лаборатории ООО «Двойная спираль». Для определения пороговых значений состояний «патологий» по сигналу магнитной напряженности были изготовлены модели, соответствующие следующим патологическим состояниям: «миокардит» и «инфаркт».

Оборудование: Установка представляет собой реалистическую функционирующую модель магнитокардиографа. Стенд позволяет рассмотреть процесс формирования магнитного поля миокардом, изучить особенности регистрации магнитного поля сердца и исследовать влияние патологий миокарда на изменение магнитного поля.

Полученные результаты. В работе предложен алгоритм классификации МГК сигналов на формы, относящиеся к фоновому ритму («норма») и отклоняющиеся от него («патология»). В качестве признака, который использовался для обучения классификатора, использовалась амплитуда МКГ сигнала: низкий уровень МКГ — все в «порядке»; высокий - нарушения в миокарде. Результаты работы классификатора продемонстрировали высокие показатели оценки точности. Представленный подход к анализу форм МГК сигналов может быть взят за основу для разработки устойчивого алгоритма ранней диагностики патологий миокарда на основе новых представлений о магнитофизике миокарда.

Новые представления о магнитофизике миокарда планируется использовать в методах МКГ-диагностики. Разрабатываемые методы ранней диагностики предполагается использовать для усовершенствования стационарных (и мобильных) МКГ-аппаратов.

Литература

1. Kocica M., Corno A. // European Journal of Cardio-thoracic Surgery. 29S (2006). S21-S40.
2. Buckberg G.D. // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. Vol No. 5. 2002.
3. Самойлов А.С., Арутюнов Ю.А. // Биомедицина. 2014. №3. с.104.
4. Струтынский А.В. Электрокардиограмма: анализ и интерпретация // М.: МЕДпресс-информ, 2012. - 224 с.

УДК 615.46

Воздействие магнитной гипертермии опосредованной наночастицами оксида железа на жизнеспособность клеток рака молочной железы MDA-MB-231

О.Я. Брикунова^{1,2}, Т.А. Боброва³, С.А. Ескин¹, А.Г. Першина^{1,2}

¹Сибирский государственный медицинский университет

²Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, Томский политехнический университет

³Национальный исследовательский Томский государственный университет

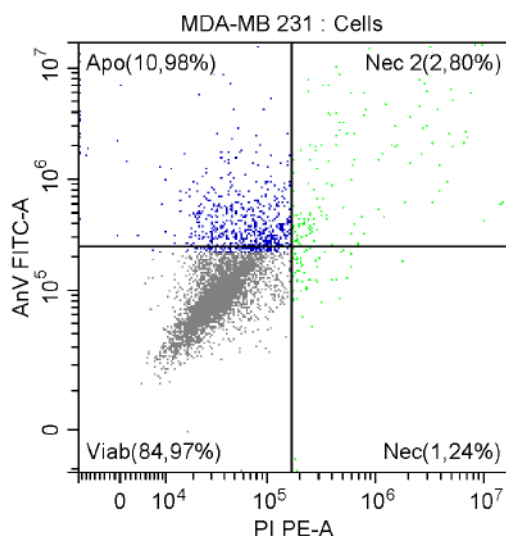
Исследована способность магнитных наночастиц оксида железа, модифицированных силиконовой оболочкой и ПЭГ, вызывать гибель опухолевых клеток линии MDA-MB-231 посредством гипертермии при наложении переменного магнитного поля.

Для исследования использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231. К клеткам добавляли наночастицы оксида железа до конечной концентрации 0,5 и 5 мг/мл и далее инкубировали без или при наложении переменного магнитного поля (AFM) с использованием генератора TOR ULTRA HT (NanoSystems, Россия). Время экспозиции AFM (напряженность 27 мТл, частота 230 кГц) составляло 2 и 24 часа. Для оценки жизнеспособности клеток использовали метод окрашивания с йодистым пропидием (PI) и FITC-меченым AnnexinV (Biolegend, США), анализ проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter).

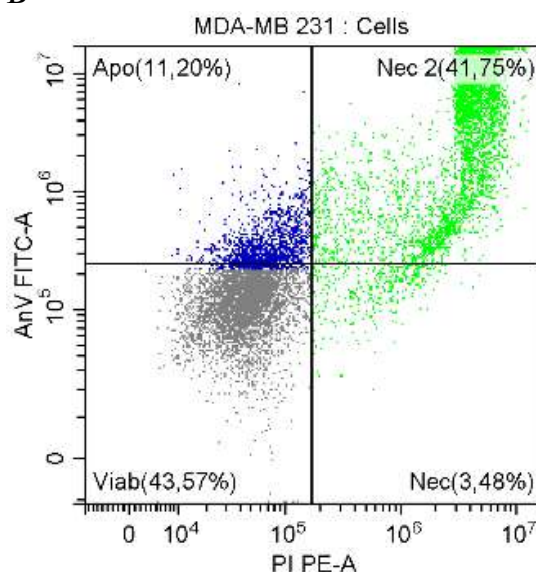
Анализ данных проточной цитофлуориметрии показал, что после 60-минутного воздействия AFM на клетки в присутствии наночастиц в концентрации 5 мг/мл, наблюдали увеличение числа клеток с цитофлуориметрическими признаками апоптоза. Было отмечено, что уже через два часа после применения переменного магнитного поля, в образцах клеток с добавлением магнитных наночастиц, доля PI⁺AnnexinV⁺ клеток возрастала до 40,7±26,7%, а через 24 часа увеличивалась до 70,9±23,2 % (Рис. 1). В образцах клеток, инкубированных с наночастицами без наложения AFM, доля PI⁺AnnexinV⁺ клеток составляла 2,8±0,4 и 9,7±1,7% через 2 и 24 часа соответственно.

Таким образом, наночастицы оксида железа, модифицированные силиконовой оболочкой и ПЭГ, способны вызывать гибель опухолевых клеток линии MDA-MB-231 за счет эффекта магнитной гипертермии и обладают потенциальным терапевтическим эффектом для лечения аденокарциномы молочной железы человека.

А



Б



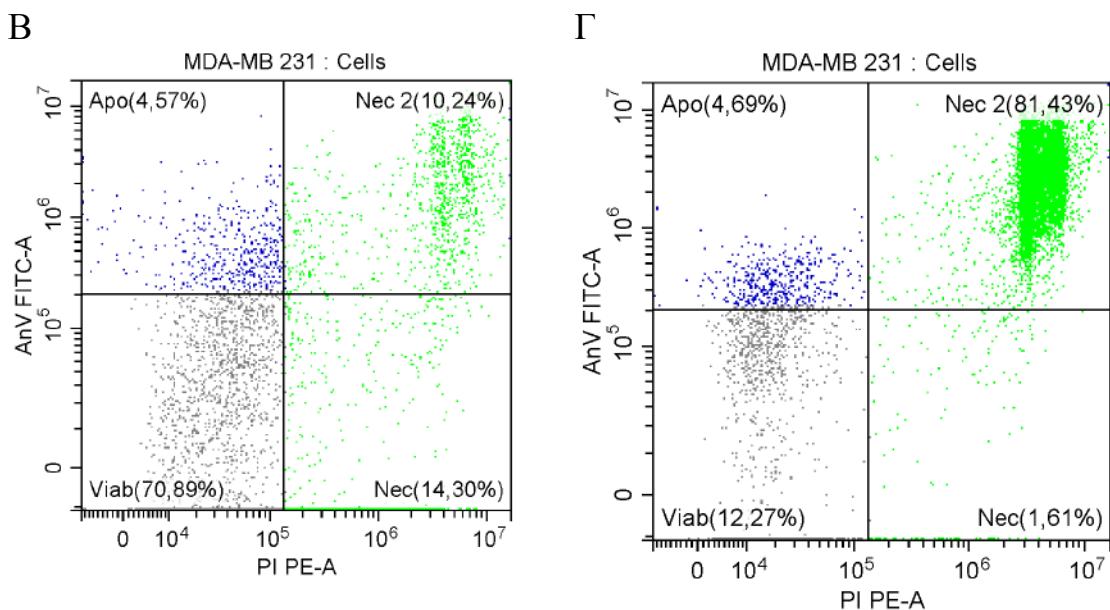


Рис. 1. Репрезентативные точечные диаграммы, полученные в результате анализа методом проточной цитофлуориметрии клеток линии MDA-MB-231, проинкубированных с наночастицами оксида железа в концентрации 5 мг/мл и окрашенных с использованием PI и FITC-меченого AnnexinV через 2 часа после инкубации (А) без и (Б) при экспозиции AFM (27 мТл, 230 кГц) в течение 60 минут, через 24 часа после инкубации (В) без экспозиции и (Г) при экспозиции AFM (27 мТл, 230 кГц) в течение 60 минут.

Литература

1. Kossatz S, Grandke J, Couleaud P, et al. Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery // *Breast Cancer Res.* 2015.
2. Giustini AJ, Petryk AA, Cassim SM, Tate JA, Baker I, Hoopes PJ. Magnetic nanoparticle hyperthermia in cancer treatment // *Nano Life.* 2010.

УДК 615.46

Доступная система для оптического картирования с открытым программным обеспечением

Д.И. Рыбашлыков, Р.А. Сюняев, J. Brennan, И.Р. Ефимов

The George Washington University

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Оптическое картирование с использованием флуоресцентных потенциал-чувствительных и кальций-чувствительных красителей является одним из важнейших современных методов изучения электрофизиологии сердца [1]. Высокоскоростные камеры, необходимые для регистрации распространения потенциала действия с достаточным пространственным и временным разрешением, обычно очень дороги. В качестве примера распространенной системы мы рассмотрели MiCAM Ultimate-L, стоимость которой составляла 90000 долларов США. Мы разработали систему для оптического картирования стоимостью менее 1500 долларов США (камера, персональный компьютер, объектив) на момент публикации, с открытым программным обеспечением для записи [2] и обработки [3] сигналов с открытым кодом.

Для этой цели нами использовалась камера IDS UI-3130CP rev.2. С использованием API uEye было разработано программное обеспечение, которое позволило увеличить временное разрешение до 977 кадров за счет уменьшения активной области сенсора в 12 раз. Итоговое разрешение со стандартных 800x600 пикселей снизилось до 200x200, что всё ещё превышает разрешение MiCAM Ultimate-L (100x100). Мы провели ряд экспериментов на препаратах сердец мыши и крысы, перфузируемых по методу Лангендорфа. Соотношение сигнал шум для сырого

сигнала было недостаточно для определения пространственно-временных характеристик распространения возбуждения (3-6dB). Однако после обработки сигнала (фильтрация фильтром с конечной импульсной характеристикой нижних частот сигнала для каждого пикселя, ядерное сглаживание с размером ядра 5x5 пикселей, коррекция базовой линии методом асимметричных наименьших квадратов [2]) при помощи программного обеспечения RHYTHM1.2 [3] был получен сигнал с мощностью 8-10dB. Как показано на рисунке 1, интенсивность сигнала достаточно высока для записи формы волны потенциала действия в ткани желудочков (рис. 1E,G) и предсердий (рис. 1C). Соотношение сигнал/шум после обработки позволило выполнить стандартные задачи оптического картирования, такие как определение длительности потенциала действия и определение последовательности активации (рис.1A). Сравнение со специализированной камерой MiCAM Ultimate-L (рис.1B,D,F,H) показало, что последовательность активации определяется с точностью до 2 мс, длительность потенциала действия - с точностью до 10 мс.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что данное решение с открытым кодом и небольшой стоимостью позволяет эффективно измерять такие физические величины как длительность потенциала действия, скорость активации.

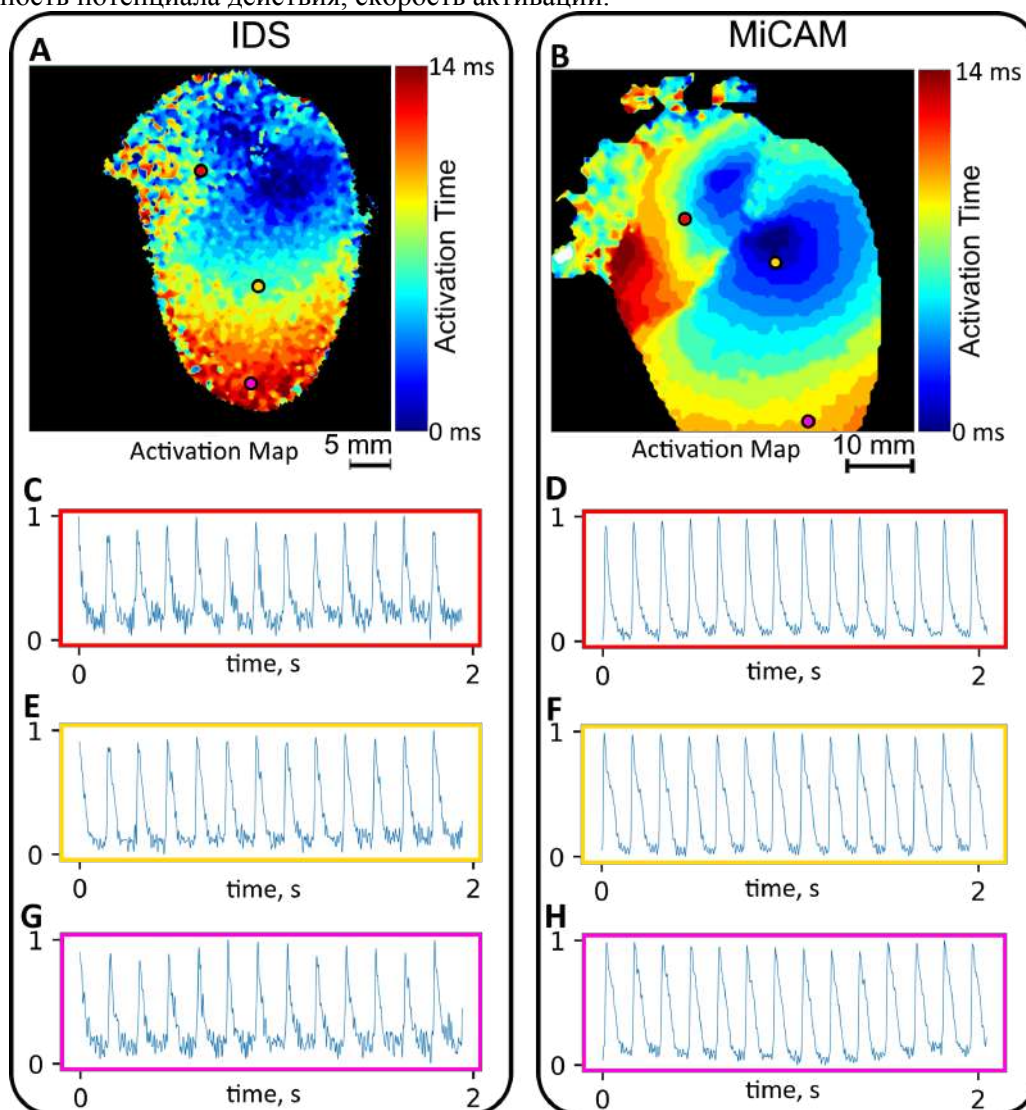


Рис.1. Сравнение карт активации и обработанных сигналов, записанных с помощью IDS и MiCAM. А:Карта активации, полученная с помощью IDS; В:Карта активации, полученная с помощью MiCAM; С: Пример сигнала, записанного из предсердия с помощью IDS; D: Пример сигнала, записанного из предсердия с помощью MiCAM; Е,Г: Примеры сигналов, записанных из желудочков с помощью IDS; F,Н: Примеры сигналов, записанных из желудочков с помощью MiCAM.

Литература

1. Boukens BJ, Efimov IR. A century of optocardiography. IEEE Rev Biomed Eng. 2014;7: 115–125.

2. <https://github.com/humanphysiologylab/ueyemappingWin>
3. <https://github.com/optocardiography/Rhythm-1.2>
4. https://www.researchgate.net/publication/228961729_Baseline_Correction_with_Asymmetric_Least_Squares_Smoothing
5. Gloschat C, Aras K, Gupta S, Faye NR, Zhang H, Syunyaev RA, et al. RHYTHM: An Open Source Imaging Toolkit for Cardiac Panoramic Optical Mapping. Sci Rep. 2018;8: 2921.

УДК 577.352.5

Измерение активационных характеристик быстрых натриевых каналов кардиомиоцита человека при физиологической температуре

С.Г. Романова¹, В.О. Абрашева¹, Ш.Р. Фролова^{1,2}, Р.А. Сюняев^{1,3}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова.

Данная работа посвящена исследованию активационных характеристик быстрых натриевых каналов (INa_v). Измерения проводились на человеческих кардиомиоцитах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) здорового донора, при физиологической температуре 37°C. Высокая амплитуда и малое характерное время активации представляет определенные сложности для измерения: падение напряжения между усилителем и внутриклеточным пространством достигает десятков милливольт, что делает трансмембранный потенциал неконтролируемым. Согласно литературным данным, большинство исследований INa_v проводят при комнатной температуре или на животных моделях [1-3], в то время как динамика активности Na_v-каналов человеческих кардиомиоцитов при физиологической температуре 37°C может сильно отличаться, что в свою очередь искажает количественное понимание процессов возбуждения кардиомиоцитов и распространения возбуждения в миокарде. В данной работе рассматривается один из таких примеров: условие гиперкалиемии, при которой в широко используемой модели О'Хара-Руди [4] распространения возбуждения не наблюдается.

С помощью электрофизиологического метода пэтч-кламп были изучены амплитуды Na-тока в кардиомиоцитах, дифференцированных из иПСК линии m34sk3, полученной от здорового донора, в 41-51 дни дифференцировки. В силу того, что амплитуда тока ионных каналов в клетке зависит от концентрации ионов в растворе [5],

$$\varphi_{Na} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na_o]}{[Na_i]} \quad (1)$$

$$I_{Na} = g_{Na}(\varphi - \varphi_{Na}) \quad (2)$$

нами был проведен ряд измерений, которые позволили оптимизировать внеклеточную концентрацию ионов Na⁺ таким образом, чтобы величина амплитуды Na-тока не превышала 1 нА при 37°C. Были рассмотрены внеклеточные растворы с концентрациями ионов натрия 5 мМ, 20 мМ и 50 мМ. В качестве основы для раствора был взят тирод [6], а также были добавлены блокаторы: 2 мМ низолдипина (блокатор кальциевых каналов L-типа) и 3 мМ ивабрадина (блокатор I_f-каналов). Концентрация ионов натрия 5 мМ оказалась недостаточной для детектирования INa_v, когда как при 50 мМ амплитуда токов была больше 2 нА. По результатам экспериментов в оптимальном растворе, содержащем 20 мМ NaCl, получены кривые активации, которые представлены на рисунке 1. На основе полученных экспериментальных данных была модифицирована формулировка натриевого тока в модели О'Хара-Руди. Погрешности полувысоты и наклона кривой активации составляли ±0,02 и ±0,02 соответственно (n=5). Моделирование распространения возбуждения в ткани желудочков в условиях гиперкалиемии показало, что в отличие от базовой модели О'Хара-Руди в модифицированной нами на основе экспериментов модели кардиомиоциты возбуждаются при внеклеточных концентрациях ионов калия от 5,4 мМ до 8,4 мМ. При этом в новой модели наблюдается зависимость скорости распространения возбуждения волны от концентрации внеклеточного калия: при повышении концентрации ионов K⁺ скорость снижается от 0,34 до 0,25 м/с.

Таким образом, в данной работе были проведены измерения быстрого натриевого тока в кардиомиоцитах человека методом пэтч-кламп при физиологической температуре. Установленная

полувысота и наклон кривой активации составляли $a = -55,32 \pm 0,02$ и $b = 2,61 \pm 0,02$. Величины погрешностей позволили сделать вывод об отсутствии значительных экспериментальных артефактов, связанных с контролем трансмембранного потенциала. Последующее математическое моделирование показало, что полученные активационные характеристики позволяют адекватно описать распространение возбуждения в условиях гиперкалиемии.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 18-71-10058.

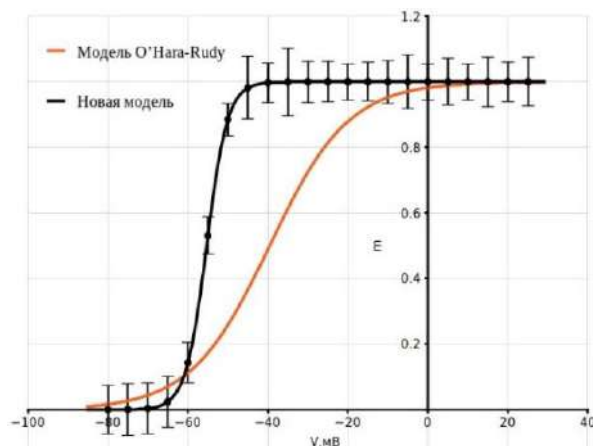


Рис. 1. Сравнение кривой активации быстрого натриевого тока, полученной нами при физиологической температуре, с оценкой модели О'Хара-Руди ($n=5$). Установленная полувысота $a = -55,32 \pm 0,02$ и наклон $b = 2,61 \pm 0,02$.

Литература

1. Sakakibara, Y., et al. Characterization of the sodium current in single human atrial myocytes. *Circulation Research*, 1992; 71(3), 535–546. doi:10.1161/01.res.71.3.535
2. Wettwer, E., et al. The new antiarrhythmic drug vernakalant: ex vivo study of human atrial tissue from sinus rhythm and chronic atrial fibrillation. *Cardiovascular Research*, 2013; 98(1), 145–154. doi:10.1093/cvr/cvt006
3. Blechschmidt S, et al. Voltage-gated Na^+ channel transcript patterns in the mammalian heart are species-dependent. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008; 98: 309–318.
4. O'Hara T, Virág L, Varró A, Rudy Y. Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation. *PloS Comput Biol*. 2011 May;7(5): e1002061
5. Рубин А.Б. Биофизика. Т.1. - М.: МГУ, 2004. - 917 с.
6. Frolova, S., et al. Stilbene derivative as a photosensitive compound to control the excitability of neonatal rat cardiomyocytes. *Bioscience Reports*, 2019. BSR20181849. doi:10.1042/bsr20181849

УДК 616-008.9

Изучения полиморфизма генов ожирения у студентов ИАТЭ

А.А. Артамонова, Л.Н. Комарова, Е.Р. Ляпунова

Обнинский институт атомной энергетики – филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

Установлено, что масса тела и склонность к ожирению обусловлены не только средовым воздействием (уровень физической активности, особенности питания и др.), но и генетическими факторами, оказывающими влияние на варьирование ИМТ в пределах 65-80%. Известны мутации некоторых генов, обуславливающие повышение ИМТ и развитие тяжёлых форм моногенного ожирения. Следует отметить, что чаще всего предрасположенность к ожирению носит полигенный характер, когда неблагоприятные средовые факторы при наличии множества аллелей (вариантов генов и других последовательностей ДНК) риска ожирения приводят к развитию заболевания. Известны десятки полиморфизмов генов, ассоциированных с предрасположенностью к ожирению. Для анализа на полиморфность генов ассоциированного с жировой массой FTO, PPARG, PPARG** было обследовано 47 студентов ИАТЭ НИЯУ МИФИ.

Перед проведением анализа у всех обследуемых лиц провели сбор медико-генетических сведений, предложив ответить на вопросы специально разработанной анкеты, провели антропометрические измерения для расчёта индекса массы тела (ИМТ). Формула ИМТ учитывает увеличение массы тела при увеличении роста и пригодна для характеристики пищевого статуса и диагностики ожирения. По результатам обследования большая часть обследуемых лиц – это 72,3% студентов имеют нормальную массу тела. Для уточнения значения ИМТ у всех обследуемых лиц определили тип распределения жира в организме человека. Для этого измерили окружность талии и обхват бедер. Из полученных результатов видно, что 89,4% обследуемых лиц имеет гиноидный тип распределения жира в организме, что может свидетельствовать о нарушении липидного обмена в организме человека. 10,6% студентов имеют промежуточный тип распределения жира в организме, что также может свидетельствовать о нарушении липидного обмена.

Затем производилось определение липидного профиля крови, что позволило определить отклонения в липидном обмене организма. Полученные данные показали, что у 80,9% студентов показатели общего холестерина в норме. Из них у одного человека показатели ЛПНП выше нормы и у одного человека эти показатели ниже нормы. У 21 человека показатели ЛПВП ниже нормы. У 100% человек показатели триглицеридов в норме. У 8% студентов показатели общего холестерина выше нормы. Из них у двух человек показатели ЛПВП ниже нормы и ни одного человека, у кого бы эти показатели были выше нормы. У трех человек показатели ЛПНП выше нормы и ни одного человека, у кого бы эти показатели были ниже нормы.

Сопоставляя результаты анкетирования, антропометрии и липидного профиля можно сделать заключение что люди, которые ограничивают себя в еде, с целью похудения имеют плохие показатели липидного профиля. А люди, у которых несколько повышенная масса тела показатели липидного профиля в норме. Но этот не относится к тем, кто имеет уже избыточную массу тела и ожирение первой степени. У них показатели липидного профиля имеют отклонения.

Для выделения ДНК из цельной крови использовали коммерческий набор «ДНК-ЭКСТРАН-1». Диагностические наборы для выявления полиморфизмов в геноме человека методом ПЦР «SNP-экспресс» в режиме реального времени были получены в фирме «Литех». Система «SNP-экспресс» представляет собой комплект реагентов для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека. Анализу подвергается геномная ДНК человека, выделенная из лейкоцитов цельной крови.

По результатам антропометрии было выделено 6 человек, у которых имеется избыточная масса тела и ожирение первой степени и нарушения липидного обмена. Мы предполагали, что у этих людей имеются нарушения на генетическом уровне, которые и привели к нарушениям липидного обмена и избыточной массе тела.

Для всех обследуемых лиц мы провели ПЦР-анализ в режиме реального времени для определения генотипа по генам ассоциированным с жировой массой FTO, PPARG, PPARG**, ответственных за генетическую предрасположенность к ожирению. По результатам ПЦР-анализа можно было определить: нормальный вариант полиморфизма генов (мутация отсутствует), мутация в гетерозиготной форме (в одном из парных генов), мутация в гомозиготной форме (в обоих парных генах). Результаты представлены в табл. 1.

По результатам анализа у всех обследуемых лиц присутствует нормальный вариант полиморфизма гена, ассоциированного с жировой массой FTO, PPARG, PPARG** и ни у кого нет наследственной предрасположенности к ожирению. И все нарушения липидного обмена, избыточную массу тела и ожирение первой степени можно объяснить только несбалансированным питанием, низким уровнем физической активности или гормональными нарушениями.

	Полиморфизм A23525T в гене, ассоциированного с жировой массой FTO	Полиморфизм Pro12Ala в гене PPARG	Полиморфизм C1431T в гене PPARG**
Гомозигота по аллели 1 (мутация отсутствует)	100%	100%	100%
Гетерозигота	0%	0%	0%
Гомозигота по аллели 2	0%	0%	0%

Таб. 1. Полиморфизм генов FTO, PPARG и PPARG**

Литература

6. Каннская, Н.В., Позднякова, И.А., Федорова, Н.А. Липидемия и липопротеины крови // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26. – № 2. – С.130–132.
7. Hansen L., Ekstram C.T., Tabanera y Palacios R. et al. The Pro 12Ala variant of the PPARG gene is a risk factor for peroxisome proliferator-activated receptor- γ/α agonist-induced edema in type 2 diabetic patients // J. Clin. Endocrinol. Met. — Vol. 91, N 9. — P. 3446–3450.

УДК 577.359

Исследование формирования сердечной ткани при патологических условиях

С.А. Щербина¹, М.М. Слотвицкий¹, В.А. Цвеляя¹, К.И. Агладзе¹.

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Ключевые слова: аритмия, оптическое картирование, стволовые клетки, ИПСК, кардиомиоциты, гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП).

Целью данной работы является получение однозначных связей между фенотипическими и генотипическими особенностями развития и формирования сердечной ткани для определения группы пациентов повышенного риска смерти от сердечной недостаточности, в частности при гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП).

В работе был применен комплексный подход к изучению формирования сердечной ткани в зависимости от внешних условий. В первую очередь, было важно смоделировать различную нагрузку на кардиомиоциты, а также развитие различных структур в зависимости от характеристик окружения. Поэтому в работе использовался метод электроспиннинга (Nanon-01), а также методы работы с полидиметилсилоксаном различной степени мягкости. Для изготовления микроволокон использовали раствор поликапролактона. После нанесения волокон на нужную подложку с помощью электроспиннинга субстраты покрывали различным белками или матриксами для повышения адгезивности (раствор фибронектина, Matrigel, Geltrex). В работе использовались несколько клеточных линий ИПСК, полученных путем репрограммирования как от здорового пациента, так и от пациента с мутацией, приводящей к ГКМП (мутация R326Q в MYBPC3). Базовым протоколом для дифференцировки был протокол активации сигнального пути WNT/ β -катенин с помощью CHIR99021 и его последующем ингибировании [1,2]. Для каждой линии протокол ставился отдельно с изменениями, как и для различных подложек. Кальциевая и электрофизиологическая активность полученных кардиомиоцитов проверялась методом оптического картирования с помощью кальций-зависимых и потенциал-зависимых красителей. Проверялось формирование непосредственно клеточной структуры кардиомиоцитов методом иммунофлуоресцентного анализа с помощью конфокального микроскопа.

В первую очередь в рамках работы было показано значительное отличие в формировании ткани на подложках с различной степенью сцепления с поверхностью. Тестировались различные матриксы и белки. Было показано, что при дифференцировке или последующей рассадке на матриксе Matrigel (сходные с ним матриксы) формирование кардиослоев происходило эффективнее в 90% случаев, также наблюдалась общая электрофизиологическая зрелость кардиомиоцитов. Если сравнить матрикс Matrigel и Geltrex, то матрикс Matrigel показывал лучшие результаты с точки зрения получаемых кардиослоев.

Затем было проведено сравнение подложек различной жесткости и степени анизотропии. Данные показали, что при сильной изначальной анизотропии матрикса формирование сердечных слоев сильно затруднено, но при изначальной изотропности подложки формирование функционального кардиослоя, способного проводить электро-механическое возбуждение, не происходило в принципе (рис. 1). Дифференцирующиеся из ИПСК в кардиомиоциты клетки на таких подложках были полностью разобщены, а возбуждение кардиомиоцитов можно было вызвать только локально. По сравнению с такими подложками клетки, полученные на твердом стекле, покрытом матриксом, показали равномерное проведение с четким и ровным фронтом волны возбуждения. Дифференцируемые клетки в кардиослои на подложках различной жесткости показали явную зависимость от протокола содержания клеток с ингибитором WNT пути.

В процессе работы также были определены значимые электрофизиологические характеристики кардиомиоцитов, полученных от пациентов с ГКМП. Для кардиомиоцитов и кардиослоев с

ГКМП характерна более интенсивная внутриклеточная кальциевая активность (рис. 2). Также интерес представляет характер электрофизиологической активности, который является регулярным, но абсолютно не соответствующим нормальному проведению (рис. 3).

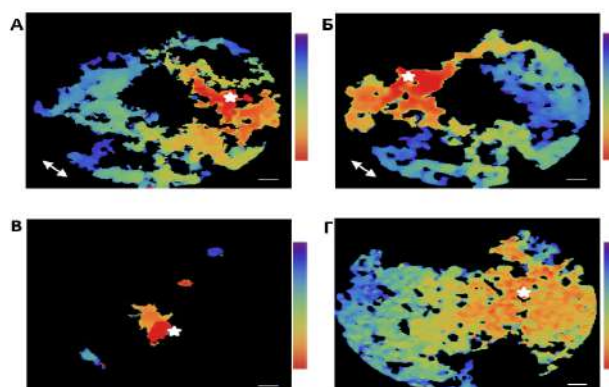


Рис. 1. Активационные карты оптического картирования дифференцированного из ИПСК монослоя кардиомиоцитов на различных подложках; а) и б) активационные карты образцов на анизотропных подложках; в) на изотропной подложке; г) на стекле, покрытой матриксом geltrex. звездочкой обозначены места стимуляции образцов точечным электродом. стрелочками указано направление волокон в случае их направленности.

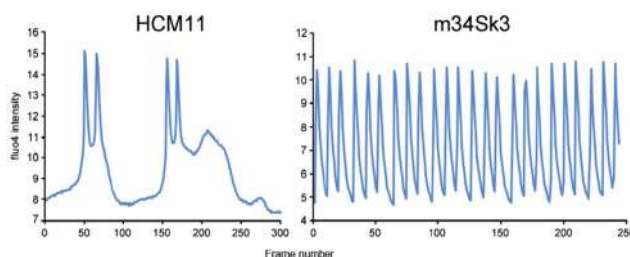


Рис. 2. Записи флуоресценции с помощью кальций-зависимого красителя для hiPSC-CMs с ГКМП (HCM11) и hiPSC-CMs от здорового донора (40-ой день дифференцировки)

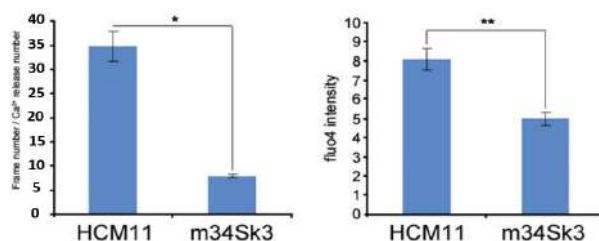


Рис. 3. Сравнение кальциевой активности внутри hiPSC-CMs (дифференцированных из ИПСК кардиомиоцитов) с ГКМП (HCM11) и hiPSC-CMs от здорового донора (40день) (*- $p < 0.01$, ** - $p < 0.05$)

В перспективе проект направлен на разработку персонализированной стратегии хирургического лечения ГКМП у молодых пациентов с ранней манифестацией заболевания на основе детального изучения анатомических, тканевых и клинических особенностей гипертрофии миокарда у больных с различными генетическими причинами заболевания.

Литература

1. Lian X. et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions // Nature protocols. – 2013. – Т. 8. – № 1. – С. 162.
2. BurrIDGE P.W. et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes // Nature methods. – 2014. – Т. 11. – № 8. – С. 855

Исследование характеристик МРТ-совместимого составного магнита для кохлеарной имплантации

Г.Н. Ткачук, А.И. Егоров, Е.М. Глуховский

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

В работе исследуются характеристики составного магнита для кохлеарного импланта, путем моделирования в программном пакете Comsol Multiphysics, AC/DC Magnetic Fields, No Currents. Исследуемая модель была разработана на базе полезных моделей RU 198574, RU 196686, RU 2727227.

Ранее, путем моделирования при различных конфигурациях устройства (геометрические размеры корпуса, количество и размер магнитных элементов и др.), была установлена оптимальная конфигурация, которая представляет собой два составных цилиндрических магнита (имплантируемый и экстракорпоральный) из титана, в каждый из которых встроено по 4 магнитных элемента диаметром 3 мм.

Целью данной работы является исследование характеристик системы из двух составных магнитов, в частности их силы притяжения, в зависимости от расположения магнитных элементов внутри корпуса и от расстояния между магнитами.

Это исследование поможет улучшить характеристики составного магнита, в частности уменьшить его размер, поможет при предварительном подборе оптимальных характеристик магнитного крепления кохлеарного имплантата на теле пациента, а также поможет найти оптимум между геометрическими размерами и характеристиками составного магнита.

Результаты данной работы будут использоваться при проектировании импортозамещающей многофункциональной системы кохлеарной имплантации для реабилитации пациентов с сенсоневральной тугоухостью.

Данная статья подготовлена при проведении НИОКР по теме «Разработка технологии изготовления и постановка на производство импортозамещающей многофункциональной системы кохлеарной имплантации для реабилитации пациентов с сенсоневральной тугоухостью» на базе «Лаборатории медицинского приборостроения» МФТИ. Финансовая поддержка осуществлялась Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

Литература

1. Патент РФ (RU) 198574 U1 зарегистрирован 16.07.2020 «Магнит кохлеарного имплантата на шаровых элементах» Глуховский Е.М., Грибок В.П., Егоров А.И.
2. Патент РФ (RU) 196686 U1 зарегистрирован 11.03.2020 «Магнит кохлеарного имплантата на шаровых элементах» Глуховский Е.М., Грибок В.П., Егоров А.И.
3. Патент РФ (RU) 2727227 C1 зарегистрирован 21.07.2020 «Магнит для кохлеарного имплантата на сферических магнитных элементах» Глуховский Е.М., Грибок В.П., Егоров А.И.
4. Заболевания кожи. Полный справочник. Под ред. Елисеевой Ю.Ю. М.: Эскимо 2011.
5. Янченко А.В. «Ограничения применения редкоземельных магнитов в электромеханических системах», сборник трудов конференции: «Производственные технологии будущего: от создания к внедрению. Комсомольск-на-Амуре, 14 июня 2019 г.», Комсомольск-на-Амуре: - Комсомольский-на-Амуре государственный университет, 2019, с. 336-340.
6. Савельев И.В. Курс общей физики. Том 2. Электричество и магнетизм. Волны. Оптика: учебное пособие., М.: Издательство "Лань", 2019, 500 с.
7. Сайт «НПО Эрга» (г. Калуга, РФ) (дата обращения 15.08.2020): <https://erga.ru/catalog/postoyannye-magnity/neodimovye-magnity-ndfeb/>
8. Jeon J.H., Bae M.R., Chang J.W., Choi J.Y. «Reversing the polarity of a cochlear implant magnet after magnetic resonance imaging». *Auris Nasus Larynx*. 2012; 39(4): pp 415-417.
9. Kim B.G., Kim J.W., Park J.J., Kim S.H., Kim H.N., Choi J.Y. «Adverse Events and Discomfort During Magnetic Resonance Imaging in Cochlear Implant Recipients». *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015; 141(1): pp 45-52.
10. Deneuve S, Loundon N, Leboulanger N, Rouillon I, Garabedian E.N. Cochlear implant magnet displacement during magnetic resonance imaging. *Otol Neurotol*. 2008; 29(6): pp 789-790.
11. Majdani O., Leinung M., Rau T. «Demagnetization of cochlear implants and temperature changes in 3.0 T MRI environment». *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008; 139: pp 833-839.
12. F. Dubrulle, A. Sufana Iancu, C. Vincent, G. Tournel & O. Ernst. «Cochlear implant with a non-removable magnet: preliminary research at 3-T MRI». *European Radiology*. 2013; vol. 23, p-p 1510-1518.

13. CN 107308543 (A) 03.11.2017 «Cochlear implant magnet and device» *Tan Zhiping, Sun Xiaolan, Xu Shiang, Qi Shuqi.*
14. US 2018296826 (A1) 18.10.2018 «Cochlear implants having MRI-compatible magnet apparatus and associated methods» *Lee Sung Jin, Walter Jeryle L, Smith James George Elcoate, Gommel Uli, Reed Stephanie M.*
15. WO 2018199936 (A1) 01.11.2018 «Cochlear implants having impact resistant MRI- compatible magnet apparatus» *Smith James, Lee Sung.*
16. CN 110545880 (A) 06.12.2019 «Cochlear implants having impact resistant MRI- compatible magnet apparatus» *Smith James, Lee Sung.*

УДК 577.352

Липид-белковый синергизм в морфологии биологических мембран

Д.В. Ивченко^{1, 2}, А.М. Варижук², П.В. Башикиров²

¹Московский физико-технический институт (научно-исследовательский институт)

²ФГБУ Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины ФМБА

Липидный бислой играет одну из ключевых ролей в жизни клетки. Это не только структурный элемент, чья роль сводится к отделению внутреннего содержимого клетки и органелл от окружающей среды. Это сложная динамическая система, чьи свойства, геометрия и состав постоянно меняются, отвечая вызовам окружающей среды и потребностям самой клетки [1].

Механизмы морфогенеза клеточной мембраны крайне многообразны. Они включают в себя полимеризацию специализированных белков на поверхности мембраны (кавеолин, клатрин, динамин), прикладывание точечной силы перпендикулярно поверхности мембраны (актин, различные белковые моторы) [2], а также открытый относительно недавно неспецифический механизм «краудинга» белков, адсорбирующихся на поверхности мембраны [3]. Для ряда периферийных белков, в том числе и домена ENTH белка эпсина человека было показано, что стерическое взаимодействие между отдельными молекулами белка на поверхности мембраны может приводить к появлению изгибного момента и, как следствие, изменению геометрии мембраны – спонтанной тубуляции гигантских униламеллярных везикул. При этом предполагается, что амфифильные полипептиды, которыми периферийные белки взаимодействуют с липидным бислоем выполняют пассивную роль «якоря», закрепляющего белок на мембране, а частичное внедрение амфипатических участков белков в липидный бислой само по себе не оказывает существенного влияния на его форму.

В данной работе мы диспутируем о роли мембранно-взаимодействующих амфипатических мотивов периферийных белков, которую они могут играть в процессах, связанных с морфогенезом клеточных мембран. Так на примере Н0 пептида ENTH домена белка пептида длиной 17 аминокислотных последовательностей нами проведено исследование взаимодействия таких пептидов с липидным бислоем различной геометрии и липидного состава, а также влияния пептидов на изменение формы и эластических параметров мембран. Методами спектроскопии кругового дихроизма нами показано, что в растворе пептид находится в состоянии статистического клубка. В присутствии отрицательно заряженных липидов DOPS или PIP2 (специфически взаимодействует с ENTH) пептид адсорбируется на поверхности мембраны, в результате чего происходит его конформационное изменение – он сворачивается в альфа-спираль. В случае неспецифического взаимодействия с заряженной мембраной пептид обладает большей аффинностью к мембранам с большей кривизной поверхности. На модельной системе - липидной нанотрубке (НТ), вытягиваемой из плоской бислоевой липидной мембраны (БЛМ) методом патч-клампа, было показано, что при встраивании Н0 спирали во внешний монослой НТ наблюдается почти двукратное уменьшение изгибной жесткости ее мембраны, в результате чего происходит сужение НТ. Была разработана теоретическая модель, объясняющая изменение модуля изгибной жесткости перераспределением спирали в градиенте кривизны мембраны между плоской БЛМ и изогнутой НТ. В данной модели предполагается, что частичное погружение спирали на границе раздела гидрофильной и гидрофобной областей липидного монослоя приводит к генерации существенной спонтанной кривизны в нем. Согласно теоретическим предсказаниям при достаточной поверхностной концентрации пептида внешний монослой должен приобретать пластические свойства, т.е. способность деформироваться без прикладывания усилий. В таком случае геометрия поверхности мембраны должна определяться спонтанной кривизной внутреннего свободного от белка монослоя. Действительно при наличии небислового ли-

пида DOPE в составе гигантской униламеллярной везикулы (ГУВ, размеры 10-100 микрон) встраивание НО пептидов в верхний монослой приводит к спонтанному вытягиванию из везикул протяжённых цилиндрических нитей – тубул. В отсутствии небислойных липидов такого эффекта не наблюдалось Рис. 1. На основании полученных результатов можно выдвинуть предположение о существовании универсального механизма регуляции геометрической формы мембран, в основе которого лежит липид-белковый синергизм.

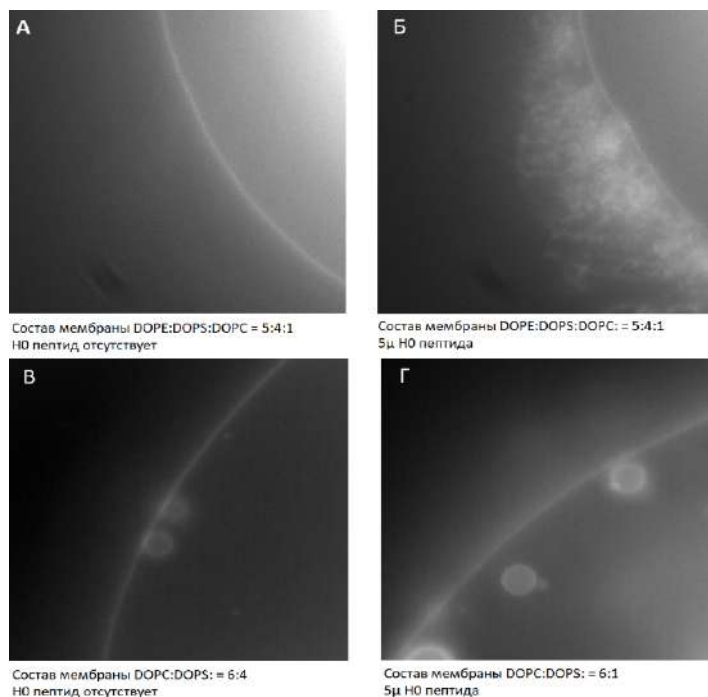


Рис. 1. На фотографиях изображены ГУВы, изображения получены методом флуоресцентной микроскопии. А) Везикула_1 содержит в своем составе 50% DOPE Б) В присутствии 5 мкмоль НО пептида спустя 5-10 минут везикула_1 начала тубулировать В, Г) Везикула_2 не имеет в своем составе DOPE, тубуляции не происходит после встраивания пептида в верхний монослой

Литература

1. McMahon H.T., Gallop J.L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling //Nature. – 2005. – Т. 438. – №. 7068. – С. 590-596.
2. Bassereau P. et al. The 2018 biomembrane curvature and remodeling roadmap //Journal of physics D: Applied physics. – 2018. – Т. 51. – №. 34. – С. 343001.
3. Stachowiak J.C. et al. Membrane bending by protein-protein crowding //Nature cell biology. – 2012. – Т. 14. – №. 9. – С. 944-949.

УДК 577.359

Модельная система имплантации кардиальных клеток с помощью полимерных микроволокон

Б.А. Римская¹, А.К. Бережной¹, М.М. Слотвицкий¹, В.А. Цвеляя¹, К.И. Агладзе¹

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

На сегодняшний день важной задачей в области регенеративной медицины является поиск оптимального метода лечения сердечной недостаточности, которая в большинстве случаев развивается в результате ишемических болезней сердца. Самые опасные для жизни пациента последствия влечет за собой инфаркт миокарда, вследствие которого в поврежденной области сердца образуется постинфарктный рубец, не проводящий электрическое возбуждение. В результате, нарушение проводимости ведет к стремительному развитию аритмий.

Одним из методов лечения сердечной недостаточности может стать заместительная клеточная терапия, которая обладает рядом преимуществ над фармакологическими методами лечения и хирургическим вмешательством, таким как пересадка сердца от донора к реципиенту.

Представленная работа посвящена разработке метода имплантации кардиальных клеток в монослой сердечной ткани с помощью полимерных микроволокон. В дальнейшем данный метод может найти свое применение в лечении постинфарктных рубцов и фиброза, что, безусловно, является ключевой задачей в период реабилитации пациента после инфаркта миокарда. По результатам экспериментов, проведенных с помощью методов оптического картирования и конфокальной микроскопии, было установлено, что использование компактных фиброиновых каркасов, чья безопасность и биodeградируемость были продемонстрированы ранее в работах других исследователей [1,2], приводит к повышению выживаемости изолированных клеток, а также значительно повышает их способность образовывать новые щелевые контакты. Таким образом, предложенный метод лечения инфаркта миокарда может стать настоящей альтернативой применяемым в клинике методам, особенно таким радикальным, как пересадка сердца.

В данной работе применялись две экспериментальные модели – неонатальные крысиные желудочковые кардиомиоциты (NRVM) и индуцированные человеческие кардиомиоциты (hiPSC-CMs), полученные путем направленной дифференцировки по оптимизированному протоколу (выход кардиальных клеток более 90%).

Использование двух различных флуоресцентных меток (Fluo4-AM, CellTracker-Red) позволило экспериментально разрешить следующую задачу: неинвазивным оптическим методом в реальном времени фиксировать внутриклеточную динамику кальция имплантированных hiPSC-CMs. Сопоставление кальциевой динамики в клетках имплантата и в клетках ткани-реципиента позволило объективно оценить функциональность новообразованных межклеточных контактов. Ранее решить такую задачу удавалось лишь для однородной ткани hiPSC-CMs [3]. Этот подход позволил с высокой точностью оценить вклад имплантатов в работу ткани по проведению волны возбуждения. Были обнаружены статистически значимые различия в количестве успешно имплантировавшихся клеток при разных методах имплантации (клетки с микроносителями и обычная суспензия). Общая площадь функционально встроившихся кластеров hiPSC-CMs в первом случае в 1.9 раз больше, а доля асинхронных клеток – ниже (3% против 19%). Однако, так как площадь клеток не всегда может быть надёжной мерой для точного определения количества клеток, более подробная оценка проводилась после фиксирования ткани и построения трехмерных изображений методом конфокальной микроскопии. Таким образом, более точное представление о количестве клеток может дать их суммарный объём, так как в зависимости от геометрической формы клеточных кластеров площадь сечения может быть разной при одном и том же объёме.

По полученным оценкам, величина V/S для клеток без микроносителей меньше, чем для клеток с микроносителями и составляет примерно 1: 1.7 (2,3 против 3,9). Это говорит о том, что при равном объёме клетки без микроносителей в среднем будут занимать большую площадь. Таким образом, зафиксированное различие повышается в 1.7 раз, то есть до 3.23.

Использование иммуноцитохимии позволило визуализировать мембранные белки Sx43, формирующие электрофизиологическую связь между имплантатом и тканью-реципиентом. Было показано, что при наличии микроносителя возрастает количество комплексов Sx43 на границе кластера клеток, что указывает на формирование щелевых контактов между клетками – при этом общий уровень экспрессии Sx43 остаётся неизменным.

По результатам данного исследования была разработана экспериментальная модель и метод для оценки эффективности имплантации кардиомиоцитов в сердечную ткань, опирающийся на объективные параметры, такие как количество клеток, образовавших функциональную электрофизиологическую связь с тканью-реципиентом. Данный метод позволяет объективно оценивать вклад имплантированных клеток в синхронное проведение волны возбуждения, и может быть применен для оптимизации протоколов имплантации hiPSC-CMs в сердца пациентов с терминальной стадией сердечной недостаточности. Более того, нами было установлено, что использование полимерных микрораспределителей в 3 раза повышает эффективность имплантации hiPSC-CMs в сердечную ткань без влияния на внутриклеточные процессы имплантатов.

Литература

1. Kundu, B., Rajkhowa, R., Kundu, S. C., & Wang, X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations //Advanced drug delivery reviews. 2013. V. 65. №. 4. P. 457-470.

2. Du, M., Gu, J., Wang, J., Xue, Y., Ma, Y., Mo, X., & Xue, S. Silk fibroin/poly (L-lactic acid-co-ε-caprolactone) electrospun nanofibrous scaffolds exert a protective effect following myocardial infarction //Experimental and therapeutic medicine. 2019. V. 17. №. 5. P. 3989-3998.
3. Slotvitsky, M. M., Tsvelaya, V. A., Podgurskaya, A. D., & Agladze, K. I. Formation of an electrical coupling between differentiating cardiomyocytes //Scientific reports. 2020. V. 10. №. 1. P. 1-11.

УДК 577.24

Оценка геропротекторной активности производных Витаферина-А на модели нематод *Caenorhabditis elegans* с применением инновационных компьютерных технологий и устройств

М.В. Будаева¹, Е.И. Марусич¹, И.С. Бендик¹, Я.А. Иваненков², В.А. Терентьев², В.С. Чернышев^{1,3}, В. А. Куликов⁴, С.В. Леонов^{1,5}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт Биохимии и Генетики РАН

³Сколковский Институт Науки и Технологий

⁴Picsart Inc

⁵Институт Биофизики клетки РАН

Поиск новых химических соединений-геропротекторов, увеличивающих продолжительность жизни человека и замедляющих его старение, является важнейшей задачей современной медицинской геронтологии. Было показано, что Витаферин-А, витанолид из группы стероидных лактонов, выделенный из растения *Withania somnifera*, издавна практикуемого в аюрведической медицине как средство профилактики преждевременного старения, обладает противораковой, противовоспалительной и противоопролиферативной активностями, проявляет нейрозащитное и антиоксидантное действия, индуцирует клеточную аутофагию. Методами *in silico* было подтверждено, что Витаферин-А является потенциальным геропротектором [1, 2].

В данной работе была проведена оценка геропротекторной активности трех производных Витаферина-А, соединений С-659, С-1053 и С-1088, на модели нематод *Caenorhabditis elegans*. Исследование проводили по основным маркерами старения, включая определение продолжительности жизни нематод (ПЖ), устойчивости к температурному (ТС) и оксидативному стрессам (ОС), локомоторной активности в присутствии тестируемых соединений. Эксперименты проводили в 96-луночном формате, в жидкой культуральной среде для нематод. Производные Витаферина-А отбирали их библиотеки химических соединений на основе компьютерных методов химического моделирования Molecular Docking и QSAR. Все соединения тестировали в концентрациях 10 μM, 1 μM, 100 nM, 10 nM и 1 nM. В качестве негативного контроля использовали нематод без обработки тестируемыми соединениями. Геропротекторы рапамицин, метформин, и резерпин использовали как положительные контроли в тех же концентрациях, что и тестируемые соединения. ПЖ оценивали в медианной численности выживших нематод на конец эксперимента, обозначенного на момент 100% смертности контрольных животных. Подсчет численности живых и мертвых червей проводили каждые три дня на микроскопе AXIO Observer Z1 (Карл Цейс, Германия). Морфологические изменения, наблюдаемые в присутствии тестируемых соединений, изучали с помощью Image Xpress Micro XL (Molecular Devices, США). Для оценки термостойкости применялся инкубатор-термостат Binder (Германия).

Результаты экспериментов по термоустойчивости продемонстрировали на 26% увеличение выживаемости нематод в присутствии С-1018 при 10 μM концентрации, по сравнению с 5% выживанием контрольных особей, через 5 часов эксперимента. С-1018 также многократно увеличивало выживаемость нематод и при остальных тестируемых концентрациях, по сравнению с контролями. Соединение С-659 только при 10 μM концентрации стимулировало увеличение термоустойчивости на 22% через 3 часа эксперимента. Было показано наибольшее увеличение на 20 % ПЖ при 10 μM и 1 μM концентрациях С-1053, несколько ниже – на 10% увеличение ПЖ в присутствии С-1088 в диапазоне концентраций 10 μM -100 nM. И лишь при 10 μM концентрации С-659 детектировали увеличение ПЖ нематод на 5%. Локомоторная активность нематод в присутствии исследуемых образцов была повышена, в ячейках с соединением С-1503 наблюдалось изменение цвета *C. elegans* на розоватый.

Для оценки влияния тестируемых соединений на подвижность нематод нами был разработан схема и изготовлен на 3D-принтере новый прибор - аналог "The C Elegans Lifespan Machine" (Университет Гарварда, Бостон, США), а также разработано компьютерное обеспечение к нему. Прибор позволяет снимать видео испытуемых объектов в режиме реального времени, а разработанное программное обеспечение дает больше возможностей для анализа получаемых данных. Оригинальная программа написана на языке Python 3 с использованием машинного обучения и компьютерного зрения. С целью расширения возможностей анализа параметров движения были написаны дополнительные алгоритмы в программе CellProfiler.

Полученные в ходе исследований результаты экспериментально подтверждают предположенную методами компьютерной химии геропротекторную активность трех новых производных Витаферина- А. Использование новых способов обработки экспериментальных данных с привлечением инновационных приборов и компьютерных технологий машинного обучения и компьютерного зрения открывают новые возможности в направлении перспективных исследований молекулярных механизмах действия новых потенциальных геропротекторов.

Исследование (компьютерный эксперимент, молекулы) выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-74-30012).

Литература

1. Berghe W. V., Sabbe L., Kaileh M., Haegeman G., Heyninck K.; Molecular insight in the multifunctional activities of Wjthaferin A. *Biochemical Pharmacology* (2012), 84, 1282-1291
2. Alam N et al (2012) Methanolic extracts of Withania somnifera leaves, fruits and roots possess antioxidant properties and antibacterial activities. *BMC Complement Altern Med* 12:175

УДК 577

Получение области возникновения реентри на монослоях желудочковых кардиомиоцитов с помощью математического моделирования

А.К. Бережной, М.М. Слотвицкий, В.А. Цвеляя, К.И. Агладзе

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Согласно исследованиям Всемирной Организации, сердечно-сосудистые заболевания являются наиболее распространенной причиной смертности среди работоспособного населения развитых стран [1]. Наибольшую опасность представляют желудочковые фибрилляции, приводящие к смерти от внезапной остановки сердца. Переход от нормального режима работы желудочков к хаотичному при желудочковой фибрилляции является непредсказуемым, однако известно, что в его основе лежит потеря устойчивости волны возбуждения с образованием спиральных волн-реентри [2]. Прогнозирование и оценка риска возникновения волн-реентри является актуальной задачей для современного здравоохранения. Именно создание комплексного пациент-специфичного теста на аритмогенность в соответствии с экспериментами с индуцированными человеческими кардиомиоцитами (hiPSC-CMs) и на основе компьютерного моделирования распространения волны возбуждения является целью данной работы.

С использованием математической модели желудочковых кардиомиоцитов, основанной на модели ten Tusscher-Noble-Noble Panfilov (TNNP) [3] была проведена работа по исследованию критических параметров возникновения «реентри». В качестве стандартного препятствия в данной работе используется непроводящая область с граничными условиями Неймана. В данной модели вычисления производятся согласно соотношениям:

$$\frac{\partial V}{\partial t} = \text{div}(D \text{grad} V) - \frac{I_{\text{ion}}}{C_m}$$

$$I_{\text{ion}} = I_1 + I_2$$

$$I_1 = I_{\text{Na}} + I_{\text{Ca}} + I_{\text{to}} + I_{\text{KS}} + I_{\text{Kr}} + I_{\text{K1}}$$

$$I_2 = I_{\text{NaCa}} + I_{\text{NaK}} + I_{\text{pCa}} + I_{\text{pK}} + I_{\text{bNa}} + I_{\text{bCa}}$$

По результатам исследования был проведен анализ на предмет наличия и характера взаимосвязи критической для возникновения «реентри» частоты стимуляции и параметров проводимости ионных токов (I_{KS} , I_{Kr} , I_{Na} и других). В качестве результата выступает область возникновения ре-

ентри в многомерном пространстве (в координатах трансмембранных токов и физических параметров волны). В дальнейшем использование параметров области может позволить проводить тесты на функциональность сердечной мышцы с высокой прогностической точностью и за небольшое время. Результаты были подтверждены соответствием с данными оптического картирования на монослоях hiPSC-CMs.[4]

Для разработки области модель требует дополнения согласно экспериментальным данным. После этого станет возможным использование разработки наряду с экспериментальными результатами или даже как альтернативу таковым.

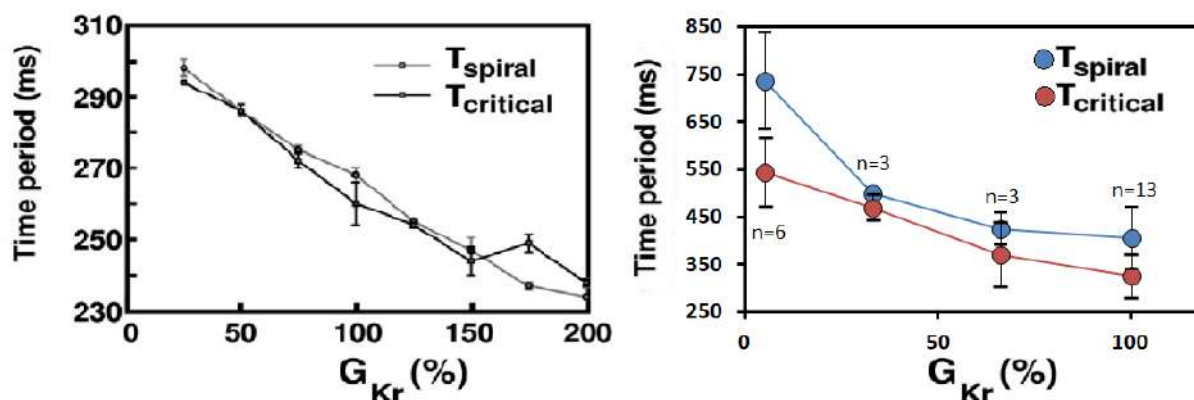


Рис.1

Рисунок 1 показывает то, как будет продолжено сопоставление модельных и экспериментальных данные. Проведение работ с использованием других токов позволит продолжить этот график до многомерной области, после того, как будут проведены соответствующие калибровки. Такая область может быть использована для разработки лекарств и сопряженных научных исследований.

Литература

1. Roth, Gregory A., et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. *Circulation* 132.17 (2015): 1667-1678
2. Gray R. A., Pertsov A. M., Jalife J. Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation // *Nature*. – 1998
3. Rupamanjari Majumder, Rahul Pandit, and A. V. Panfilov. Turbulent electrical activity at sharp-edged inexcitable obstacles in a model for human cardiac tissue // *American Journal of Physiology*, 2014
4. Podgurskaya A. D. et al. The Use of iPSC-Derived Cardiomyocytes and Optical Mapping for Erythromycin Arrhythmogenicity Testing // *Cardiovascular toxicology*.

УДК 615.471, 534.32, 004.934

Разработка алгоритма кодирования звука для системы кохлеарной имплантации

Е. М. Глуховский¹, А. И. Егоров¹, М. И. Каранетяни¹

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

В данной работе авторами была разработана стратегия стимуляции для нового устройства системы кохлеарной имплантации, разрабатываемой командой МФТИ. Построена модель, дающая представление о том, как человек с кохлеарным имплантом будет воспринимать звук, обработанный стратегией кодирования речи.

Уже существует несколько различных стратегий, позволяющих стимулировать рецепторы улитки (CIS, ACE, HiRes, SPEAK и другие), которые применяются в зарубежных аналогах. О принципах их работы известны лишь общие сведения. За основу были взяты два наиболее распространенных алгоритма – ACE и CIS [2], но, тем не менее, базовые блоки нашего алгоритма были реализованы несколько иначе. Аналогично стратегии CIS на начальном этапе обработки была использована фильтрация. Затем был применен рекурсивный алгоритм Герцеля [1], нелинейное сжатие и фильтр нижних частот. В ходе анализа количества действий, необходимых для использования того или иного метода, было показано преимущество применения алгоритма Герцеля вместо быстрого преобразования Фурье для экономии вычислительных ресурсов.

Качество работы нашей стратегии оценивалось на слух путем сравнения звука, полученного с помощью обратного преобразования, и исходного сигнала. Мы не могли учесть многих индивидуальных физиологических факторов, таких как перекрестная стимуляция соседних каналов, состояние нервных окончаний индивида. Тем не менее, используя описанные упрощения, мы получили, что информация, передаваемая посредством стимуляции кохлеарной зоны нашей стратегией, позволяет разборчиво воспроизводить речь.

На Matlab была написана программа, с помощью которой можно провести преобразование любого звукового сигнала и послушать, как этот звук может восприниматься человеком с кохлеарным имплантом.

В ходе работы были построены амплитудные спектры исходных (см. рис.1), а также получаемых после восстановления сигналов с использованием фильтров с бесконечной и конечной импульсной характеристикой, окна Хана и преобразования Герцеля, приведена схема разработанного алгоритма, построены графики исходного и конечного сигналов, а также сигнала на промежуточных этапах обработки. Таким образом, представлена новая стратегия стимуляции для систем кохлеарной имплантации, оптимизирующая вычислительные затраты, используемые для обработки звука, и продемонстрированы ее основные преимущества.

Работа подготовлена при проведении НИОКТР по теме «Разработка технологии изготовления и постановка на производство импортозамещающей многофункциональной системы кохлеарной имплантации для реабилитации пациентов с сенсоневральной тугоухостью» на базе «Лаборатории медицинского приборостроения» МФТИ. Финансовая поддержка осуществлялась Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

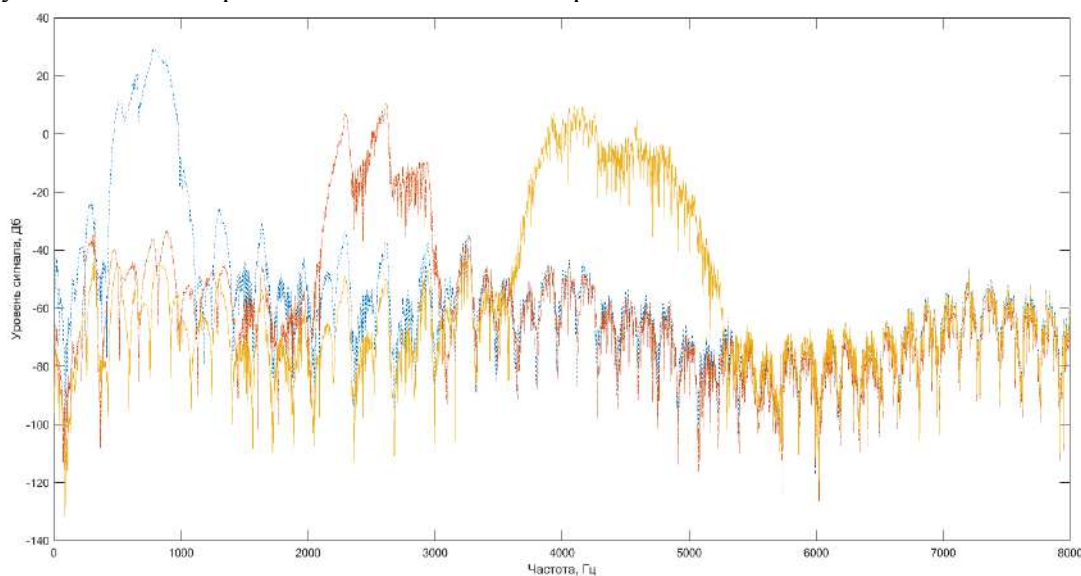


Рис. 1. Амплитудный спектр сигнала в 5м, 12м и 15м канале стимуляции.

Литература

1. *Оппенгейм А, Шафер Р.* Цифровая обработка сигналов // Москва: Техносфера, 2012. – 1048 с.
2. *Choi C. T. M., Lee Y.-H.* A Review of Stimulating Strategies for Cochlear Implants // Cochlear Implant Res. Updat. 2012. T. 2. № 2005.

УДК 615.277.3

Синтез и физико-химическое исследование димерных наночастиц магнетит-золото

П.К. Гифер¹, М.В. Ефремова¹

¹Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»

Возможность интеграции нескольких функций в одной димерной наночастице с регулируемым составом, размером и морфологией является многообещающей стратегией достижения новых свойств для дальнейшего применения в различных областях науки и технологий. Среди подобных гибридных наноматериалов именно структуры на основе благородных металлов [1] и магнитных

материалов [2] показывают уникальные биологические, оптические и магнитные свойства. Наиболее ярким примером являются бифункциональные наночастицы магнетит-золото, перспективные для применения в магнитно-резонансной томографии (МРТ), мультимодальной визуализации, гипертермии, направленной доставке лекарственных препаратов. При этом свойства таких материалов могут быть улучшены наличием возможности контролировать форму и размер каждого компонента в структуре по отдельности [3].

Гантелевидные наночастицы на основе Fe_3O_4 получают стандартным путем разложения пентакарбонила железа ($\text{Fe}(\text{CO})_5$) на поверхности наночастиц Au [4]. Причем НЧ Au получают как в процессе самого синтеза гантелевидных наноструктур (образцы PG-1 и PG-2), так и отдельно (образцы PG-3, PG-4), используя в качестве прекурсора соль золота HAuCl_4 . Впоследствии полученные образцы были переведены в водную фазу при помощи DSPE-PEG-COOH. Кроме того, варьируя такие параметры синтеза как растворитель, восстановитель, время изотермической выдержки и количество прекурсоров в смеси, менялись и морфология, и размер полученных НЧ магнетита, ПЭМ-микрофотографии которых представлены на рис. 1.

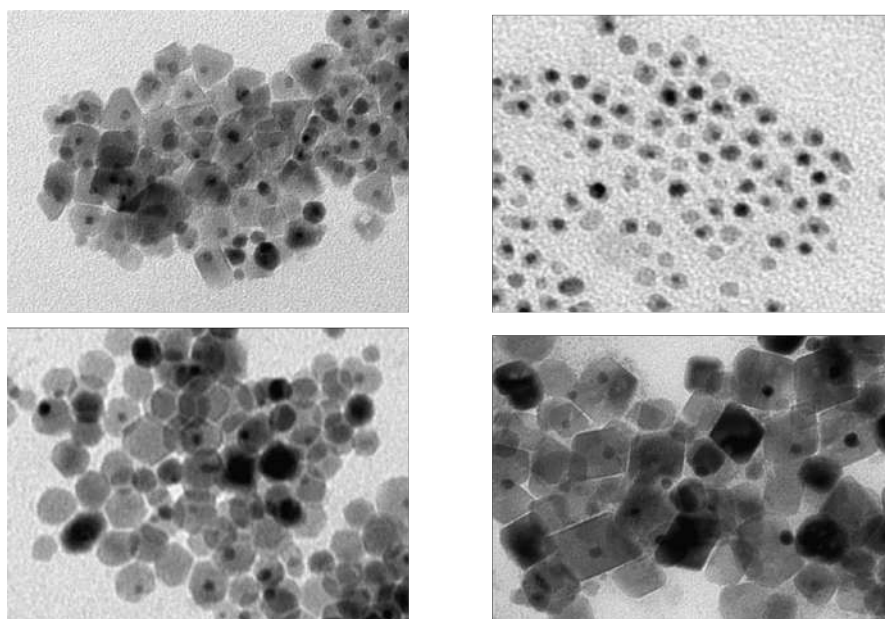


Рис. 1. Микрофотографии полученных образцов димерных наночастиц Fe_3O_4 -Au

Полученные НЧ обладают гантелевидной структурой и имеют различные размеры, морфологию, магнитные свойства и тепловыделение, представленные в таблице 1.

Образец	PG-1	PG-2	PG-3	PG-4
Размер Fe_3O_4 , нм	19 ± 4	7 ± 1	14 ± 3	44 ± 9
Размер Au, нм	6 ± 2	3 ± 1	4 ± 2	8 ± 2
M_s , э.м.е./г	78	42	53	77
H_c , Э	52	37	49	135
SAR, Вт/г	260	50	60	390

Таб. 1. Результаты комплексного изучения свойств образцов

Результаты рентгеноструктурного анализа показали, что во всех образцах действительно содержались только две фазы: магнетит и золото, при этом их объемное соотношение во всех образцах идентично в пределах погрешности. При изучении магнитных свойств было обнаружено, что зависимость намагниченности от внешнего магнитного поля для всех образцов имеет нелинейный характер, а с увеличением размера наночастиц магнетита растут коэрцитивная сила и величина их удельной намагниченности насыщения, что связано с уменьшением доли разупорядоченных магнитных моментов на поверхности наночастиц и приближением структуры наночастиц к объемному магнетиту. Также было установлено, что с ростом размера НЧ происходит также повышение удельного коэффициента поглощения (SAR), являющегося ключевым параметром в магнитной гипертермии, который достигал максимального значения около 400 Вт/г для образца с размером магнетита 44 нм. Более того, эти значения были получены при достаточно небольшой концентрации магнетита – $3 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$.

В ходе последующих сравнений образцов, оптимальным с точки зрения дальнейшего применения в магнитной гипертермии был выбран образец PG-1 со значением удельного коэффициента поглощения $255 \text{ Вт} \cdot \text{г}^{-1}$ (Fe_3O_4 19 нм) и с хорошей стабильностью в воде вплоть до концентрации 13 мг/мл.

Эффективность магнитной гипертермии с использованием образца PG-1 была также подтверждена *in vitro* на клетках аденокарциномы молочной железы мыши 4T1. При этом воздействие ПМП в течение 15 мин не вызвало значительной гибели клеток ($22 \pm 1\%$, МТТ-тест) по сравнению с клетками, инкубированными при 37°C с наночастицами или без них в отсутствие магнитного поля. Однако 30 мин воздействия переменного магнитного поля достаточны для уничтожения $79 \pm 8\%$ клеток в соответствии с данными МТТ-теста.

Литература

1. Daniel M.C., Astruc D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology // Chem. Rev. 2004. V. 104. P. 293-346.
2. Likhitar S., Bajpai A.K. Magnetically controlled release of cisplatin from superparamagnetic starch nanoparticles // Elsevier. Carbohydrate Polymers. 2012. V. 87. P. 300-308.
3. Liu S., Guo S., Sun S. Dumbbell-like Au- Fe_3O_4 nanoparticles: a new nanostructure for supercapacitors // Nanoscale. 2015. V. 7. P. 4890-4893.
4. Yu H., Chen M., Rice P. Dumbbell-like Bifunctional Au- Fe_3O_4 Nanoparticles // Nano Letters. 2005. V. 5. P. 379-382.

УДК 57.045

Технология выделения клеток из нематод *Caenorhabditis elegans*-модельных объектов для изучения воздействия космической радиации на живые организмы

И.А. Сивцев¹, Е.И. Марусич¹, Д.В. Молодцова², Н.М. Сметанина², Д.В. Гурьев², С.В. Леонов^{1,3}

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

² ФГБУ Государственный научный центр

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России

³ Институт Биофизики клетки РАН

Бурный интерес к изучению космоса и в особенности к дальним космическим путешествиям, обусловил исследования в области комбинированного воздействия пониженной гравитации и галактических космических лучей на живые объекты различного уровня организации в качестве особенно значимых и актуальных. Настоящее исследование посвящено изучению влияния космических излучений на стабильность ДНК, в частности на индукцию двунитевых разрывов ДНК в клетках живых организмов. Эксперименты будут проводиться на модельном организме *Caenorhabditis elegans* (нематода), для которого известны полный геном, строение и функциональные особенности. Впервые живые нематоды *C. elegans* будут отправлены в стратосферу при соблюдении условий, максимально приближенных к их естественным условиям обитания.

Возможность выделения популяций нематод на всех стадиях их эмбрионального развития, включая яйца, нематоды стадий L1 и L4, обусловила стратегию постановки экспериментальных исследований на *C. elegans*. В ходе нашего эксперимента были отработаны условия, необходимые для доставки живых нематод в стратосферу. Черви культивировались в 6-луночных планшетах на твердом агаре с бактериями *E. coli* OP50 в качестве источника питания. Были оптимизированы количества яиц для загрузки на агар, а также нематод стадий L1 и L4, из которых впоследствии будут выделены изолированные клетки. Известно, что в эмбриогенезе наряду с активным делением и дифференцировкой клеток, также происходит и их активная миграция, обуславливающая нормальное развитие организма. Полагаем, что не последнюю роль в этих процессах играет гравитационная сила. В связи с этим планируется оценить процент выживаемости эмбрионов нематод после комбинированного воздействия космического излучения и пониженной гравитации по количеству вылупившихся яиц. Кроме того, будет проанализирован уровень двунитевых разрывов ДНК в выделенных клетках нематод стадий L1 и L4 как показатель жизнеспособности развивающегося организма. Результаты тестирования биоматериала, длительное время находящегося в стратосфере, будет сравниваться с результатами наземных экспериментов в привычных условиях гравитации.

Нами были отработаны и оптимизированы методики выделения клеток из червей, находившихся на стадии L1 и L4 по существующим протоколам [1]. Для разрушения оболочки червя были протестированы три протеазы: протеаза стандартная, протеаза Е и протеаза Р (Кальбиохим, Германия). Наши результаты показали возможность гидролиза оболочек нематод всеми протестированными протеазами. Были оптимизированы условия культивирования нематод до стадии L4, позволяющие исключить использование малодоступной и дорогостоящей среды CeHR, обеспечивающей развитие нематод до взрослой формы в отсутствии *E. coli* OP50. Предложено использование антибиотиков для селекции эукариотических клеток в смешанной клеточной популяции, а также способ отделения бактериальных клеток, которыми кормили нематод, методом проточной цитометрии (BioRad, США). В популяциях выделенных клеток L1 и L4 были охарактеризованы морфологические различия разнообразных типов клеток методами световой микроскопии. Клетки также были разделены по морфологическим признакам на группы, что позволит изучать их по отдельности. Таким образом, были получены изолированные клетки нематод на личиночных стадиях L1 и L4, что позволит в дальнейшем оценить комбинированное воздействия космической радиации и пониженной гравитации на живые организмы в условиях эксперимента.

Литература

1. Zhang S. and Kuhn J.R., Cell isolation and culture (February 21, 2013), WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.157.1, <http://www.wormbook.org>.

УДК 612.822

Технология регистрации нейронной активности при помощи миниатюрного флуоресцентного микроскопа в исследовании нейронно-сетевых механизмов пластичности

А.Б. Исаев^{1,2}, Н.А. Асеев², М.В. Роцин², И.В. Смирнов²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²ФГБУН Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН

Изучение активности нервных клеток, включенных в морфофункциональные ансамбли, является актуальным направлением в нейрофизиологии. В этой связи значительный интерес представляют достижения последних лет в области флуоресцентной микроскопии [1]. Достигнутое усовершенствование кальциевых индикаторов и средств их доставки, миниатюризация элементной базы позволяют с высоким пространственно-временным разрешением осуществлять *in vivo* регистрацию активности больших популяций нейронов головного мозга мыши в свободном поведении.

Целью данной работы было внедрение и отработка новых технических возможностей, предоставляемых методикой кальциевой визуализации, которые позволяют расширить область приложения классической модели ассоциативного обучения мышей, в рамках которой электрокожное раздражение сочетается с условным стимулом – помещением животного в контекст.

Для проведения поведенческих экспериментов было разработано и изготовлено необходимое материальное обеспечение – бокс для животного с электрифицированным полом (контекст), устройство управления, управляющее программное обеспечение. Аппаратное обеспечение разрабатывалось с учётом наработок иностранных авторов [2].

В ходе работы были успешно проведены эксперименты в парадигме контекстного условно-рефлекторного замирания, осуществлялась долговременная запись активности больших популяций нейронов гиппокампа мыши совместно с видеофиксацией параметров поведения животного с двух ракурсов.

Анализ полученных записей поведения позволил извлечь траектории движения мыши, выделить паттерны поведения. Из записей нейронной активности были выделены временные следы активности нейронов, находящихся в поле зрения записывающего устройства.

Отработка экспериментальной методики, анализ полученных записей нейронной активности и поведения животного во время научения позволят продвинуться в изучении механизмов формирования памяти, исследовании роли гиппокампа в функционировании кратковременной памяти, процессов консолидации и создания долговременного следа памяти.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-04-00874.

Литература

1. T.-W. Chen [et al.], Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity, Nature, vol. 499, article 7458, pp. 295–300, jul. 2013.
2. P. A. Amaral-Júnior [et al.], A custom microcontrolled and wireless-operated chamber for auditory fear conditioning, Front. Neurosci., vol. 13, article 1193, 07 Nov. 2019.

УДК 577.359

Экспериментальное обоснование тополого-физиологической модели электропроводящей системы сердца, основанной на новых представлениях об анатомии миокарда

Е.А. Арутюнова¹, Ю.А. Арутюнов², А.М. Борщевская³, Е.А. Чащин⁴

¹ Wellesley College

² «Физтех-лицей» им. П.Л. Капицы

³Муниципальное общеобразовательное учреждение «Лицей № 14»

⁴Ковровская Государственная Технологическая Академия имени В. А. Дегтярёва

В начале 21 века американским кардиохирургом Джеральдом Бакбергом и другими зарубежными специалистами было сделано открытие, которое изменило привычное понимание об устройстве сердечной мышцы. Исследования этих ученых показали, что миокард сердца разворачивается в толстую изогнуто-скрученную полосу с топологией листа Мебиуса [1, 2]. Это открытие привело к новым представлениям о физико-механических и электрофизических характеристиках сердца.

Решая вопрос о физико-механических характеристиках сердца и создании модели электропроводящей системы сердца, было предположено, что разработка модели должна основываться на исследовании топологии полосы Мебиуса. С этой целью были проведены эксперименты для моделирования волн возбуждения на электропроводящем кольце и полосе Мебиуса (рисунок 1, а).

Говоря о тополого-физиологическом представлении электропроводящей системы сердца, а именно о пучке Гисса, левой и правой ножках пучка, волокнах Пуркинье и т.д., было предположено, что при разворачивании миокарда в ленту Мебиуса, правая ножка пучка Гисса оказывается на внутренней стороне правого желудочка, а левая ножка Гисса на внутренней стороне левого предсердия. Значимой причиной этого является тот факт, что устоявшееся дипольное приближение В. Эйнтховена [3], согласно которому сердце есть токовый диполь с дипольным моментом, который поворачивается, изменяет свое положение и точку приложения за время сердечного цикла (рисунок 1, б), не объясняет различие амплитуды ЭКГ сигнала в стандартных отведениях.

Чтобы оценить электрическую активность сердца в работе, на образцах имитаторов было экспериментально изучено взаимоотношение положения электродов (рисунок 1, а) на амплитуду сигнала. Отсутствие зависимости амплитуды сигнала от положения подвижного электрода осциллографа было подтверждено результатами исследований, полученных на электропроводящем кольце. При проведении экспериментов на образце с топологией Мебиуса, было выявлено, что форма сигнала регистрируемого электродами осциллографа так же как и в предыдущем опыте повторяет форму сигнала генератора, однако амплитуда изменяется (рисунок 2) и качественно соответствует результатам ЭКГ в отведениях. Таким образом, сравнительное моделирование волн возбуждения на электропроводящем кольце и полосе Мебиуса показало, что, в сравнении с кольцом, полоса Мебиуса адекватно имитирует ЭКГ сигнал.

Описанные представления о топологически правильной модели электропроводящей системы сердца, сделанные на основании открытия об анатомии миокарда и его топологии как неориентированной поверхности, могут быть использованы при разработке новых диагностических методов ЭКГ. Для дальнейшего развития исследований электрофизических характеристик миокарда и получения более точных результатов изготавливаются анатомическо-морфологические подобные модели, соответствующие новым представлениям об анатомии миокарда. При этом, все электрофизические показания должны сниматься непосредственно с изготовленных моделей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-07-00874/20).

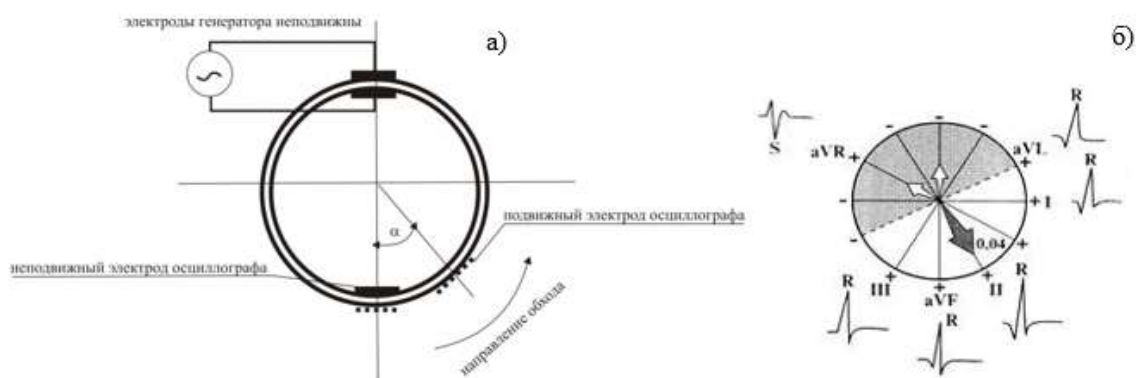


Рис. 1. Схема эксперимента (а) и электрическая активность миокарда (б)

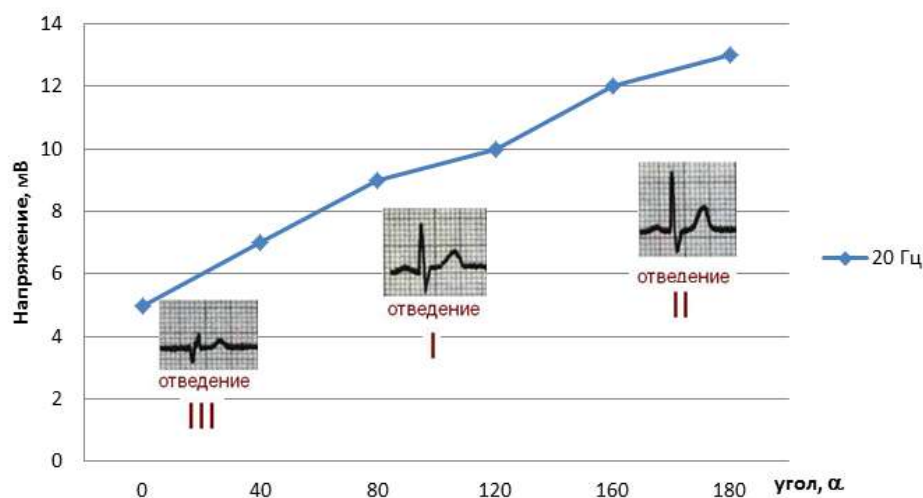


Рис. 2. Соответствие сигналов известным результатам ЭКГ

Литература

1. Kocica M., et al. The helical ventricular myocardial band: global, three-dimensional, functional architecture of the ventricular myocardium // European Journal of Cardio-thoracic Surgery. 2006. V.29. P. 21-40.
2. Buckberg G.D. Basic science review: The helix and the heart // The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2002. V. 124. Issue 5. P. 863-883.
3. Хаимзон И.И., Бондарчук И.П. Электрофизиологическая модель сердца (виртуальное сердце) // Клиническая информатика и Телемедицина. 2011. Т.7. Вып.8. С. 10-15.

УДК 13058.612

Активность нейронов височной коры и гиппокампа в периоды центрального апноэ сна у кошек

А.В. Лиманская¹

¹Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН

В регуляцию дыхания вовлечены многие структуры мозга: как специализированные дыхательные нейроны, так и «высшие» отделы головного мозга (кора, базальные ганглии). Известно, что в бодрствовании дыхание подчиняется, сознательному контролю, способность к которому теряется с переходом ко сну, при этом связи между центральными регулирующими структурами, лёгкими и дыхательной мускулатурой сохраняются. В настоящее время ряд исследователей склоняется к выводу, что изолированные, повторяющиеся 5-7 раз в час во время сна центральные остановки дыхания на 4-15 с у кошек и на 8-20 с у человека, скорее всего не являются патологией сами по себе, а отражают нормальную функцию дыхания во время сна у человека [1, 2, 3] и животных [4,5,6,7,8]. И хотя функциональное назначение этого явления для организма до конца не выяснено, известно, что

количество апноэ, их длительность и повторяемость могут свидетельствовать об определенных функциональных состояниях организма [9], и изменяться с возрастом [10, 11, 12]. Ранее в наших исследованиях было обнаружено, что изолированные эпизоды центрального апноэ сна у кошек сопровождаются характерным комплексом изменений в работе других висцеральных систем — в первую очередь, сердца, а также органов желудочно-кишечного тракта. Каждому эпизоду центрального апноэ предшествует увеличение частоты сердечных сокращений, сменяющееся, затем, брадикардией на весь период отсутствия дыхания. В половине случаев, во время апноэ прекращаются движения глаз, а в 60 процентах — снижается моторика желудка и кишечника [8, 13].

Согласно висцеральной теории сна [14], при переходе от бодрствования ко сну центральная нервная система, в частности, все зоны коры, переставая получать приток сенсорной, экстероцептивной, информации от органов чувств и скелетно-мышечной системы, переключается на обработку интероцептивных сигналов от внутренних органов различных висцеральных систем (пищеварительной, сердечно-сосудистой и др.). Важную роль в информационном обеспечении перехода от бодрствования ко сну висцеральная теория сна отводит гиппокамп нейроны которого, как ожидалось, в периоды сна также подключаются к обработке висцеральных сигналов [15]. В рамках висцеральной теории сна можно было ожидать, что в коре мозга возможно есть активность, сопутствующая эпизодам центрального апноэ сна.

Цель настоящей работы — проверка гипотезы о связи активности нейронов височной коры и гиппокампа с эпизодами центрального апноэ сна у кошек.

Оказалось, что активность трети зарегистрированных нейронов височной коры и гиппокампа достоверно изменяется перед моментами начала апноэ и на период остановки дыхания. При этом, максимум активации нейронов гиппокампа на 2-2,5 с предшествует максимуму частоты сердечных сокращений, а значительное снижение активности нейронов приходится непосредственно на момент остановки дыхания. Большинство зарегистрированных нейронов височной коры, чья активность связана с апноэ, активируется также перед максимумом частоты сердцебиения, опережая его на 0,5-1с, затем активность значительно снижается. Полученные данные свидетельствуют в пользу нашего предположения о том, что центральное апноэ — это координированная реакция всего организма, затрагивающая не только дыхательную систему, и позволяют высказать гипотезу, предлагающую объяснение функционального назначения этого явления. В гиппокампе и височной коре есть группы нейронов-кандидатов, которые возможно и инициируют данный комплексный и скоординированный процесс.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-04-00215 А

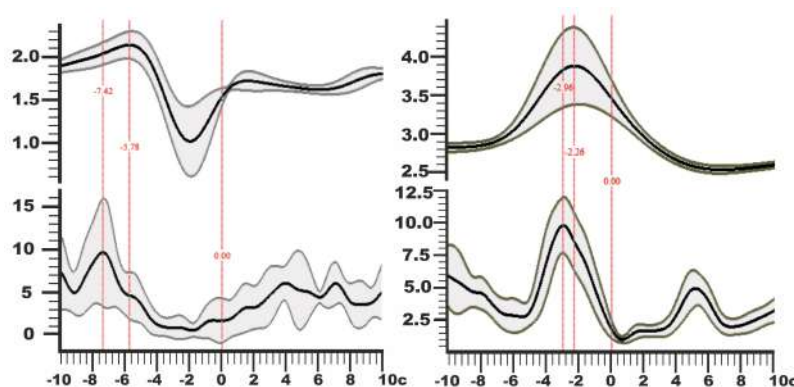


Рис. 1. Результат усреднения кривой частоты сердечных сокращений в секунду (верхняя строчка) и кривой частоты изменения импульсации одного нейрона (нижняя строчка) по шести моментам начала апноэ (отмечены вертикальной красной линией в нулевом положении). Слева — результат усреднения записи активности нейрона гиппокампа, справа — височной коры. Вертикальными линиями отмечено время максимума импульсации нейрона и максимума частоты сердцебиения. Нейрон гиппокампа на 2 секунды опережает максимум частоты сердцебиения; максимум импульсации нейрона слуховой зоны височной коры.

Литература

1. Guilleminault C. State of the art sleep and control of breathing. // Chest 1978. V. 72. № 2. P. 293-299.
2. Malhotra A., Bertisch S., Wellman A. Complex sleep apnea: it isn't really a disease. // Journal of Clinical Sleep Medicine 2008. V. 4. № 5. P. 406-408.
3. Cowie M. R. Sleep apnea: state of the art. // Trends in cardiovascular medicine 2017. V. 27 № 4. P. 280-289.
4. McGinty D.J., London M.S., Baker T.L., Stevenson M., Hoppenbrouwers T., Harper R.M., Sterman M.B.,

- Hodgman J.* Sleep apnea in normal kittens. // *Sleep*. 1979. V. 1. № 4. P. 393-412.
5. *Christon J., Carley D.W., Monti D., Radulovacki M.* Effect of inspired gas on sleep-related apnea in the rat. // *J. of applied physiology* 1996. V. 80. № 6. P. 2102-2107.
 6. *Davis E.M., O'Donnell C.P.* Rodent models of sleep apnea. // *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2013. V. 4. № 5. P. 403-405.
 7. *Nakamura A., Fukuda Y., Kuwaki T.* Sleep apnea and effect of chemostimulation on breathing instability in mice. // *Journal of Applied Physiology* 2003. V. 94. № 2. P. 525-532.
 8. *Лиманская А.В., Бусыгина И.И., Лаврова В.Д., Пугарёв И.Н.* Полисмонографическое исследование центрального апноэ сна у кошек // *Сенсорные системы*, 2019. Т. 33, № 1, с. 77-83.
 9. *Hoppenbrouwers T., Hodgman J.E., Arakawa K., McGinty D.J., Mason J., Harper R.M., Stermann M.B.* Sleep apnea as part of a sequence of events: a comparison of three months old infants at low and increased risk for sudden infant death syndrome (SIDS). // *Neuropediatrics* 1978. V. 9. 4. P. 320-337.
 10. *Carskadon M.A., Dement W.C.* Respiration during sleep in the aged human. // *J. of Gerontology* 1981. V. 36. № 4. P. 420-423.
 11. *Bixler E.O., Vgontzas A.N., Have T.T., Tyson K., Kales A.* Effects of age on sleep apnea in men. Prevalence and severity. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998. V. 157. P. 144-148.
 12. *Donovan L.M., Kapur V.K.* Prevalence and characteristics of central compared to obstructive sleep apnea: analyses from the sleep heart health study cohort. // *Sleep* 2016. V. 39. № 7. P. 1353-1359.
 13. *Limanskaya A.V., Busygina I.I., Levichkina E.V. and Pigarev I.N.* (2020) Complex Visceral Coupling During Central Sleep Apnea in Cats. *Front. Neurosci.* 14:568. doi: 10.3389/fnins.2020.00568
 14. *Пугарев И.Н.* Висцеральная теория сна. // *Журн. высш. нервн. деят.* 2013. Т. 63. №1. С. 86.
 15. *Пугарев И.Н., Пугарева М.Л.* Сон, эмоции и висцеральный контроль. // *Физиология человека*. 2013. Т. 39. № 6, стр. 31 – 44.

Секция физико-химической биологии и биотехнологии

Председатель: З.О. Шенкарев (д. ф.-м. н., проф.), А.С. Заседателев (д. ф.-м. н., проф.), Е.Е. Куликов (к. б. н.)

Зам. председателя: П.В. Пантелеев (к. х. н.), В.Н. Лазарев (д. б. н., доц.), Е.И. Марусич (к. б. н.)

Секретарь: К.А. Провоторова, М.В. Молдавер, И.М. Афанасьев

Дата: 24.11.2020 Время: 10:00

УДК 620.3

Адресные противораковые наночастицы полилактид-ко-гликолида, загруженные фотосенсибилизаторами, для детекции и фотоиндуцируемой элиминации HER2-сверхэкспрессирующих опухолей

А.С. Согомонян^{1,2}, В.О. Шипунова^{1,2}, С.М. Деев^{1,2}

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

²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

Разработка наночастиц для безопасного переноса активных веществ и визуализации опухолей *in vivo* является перспективным направлением в лечении онкозаболеваний. Наночастицы различной природы применяются в тераностике – направлении биомедицины, которое подразумевает объединение двух функций в одном препарате – диагностической и терапевтической. Наночастицы, обладающие свойством фототермически-индуцированного нагрева или продукции активных форм кислорода, а также нагруженные распознающими молекулами и терапевтическими соединениями, являются перспективными средствами тераностики [1]. Целью исследования является создание таких наносистем, которые объединяют в себе терапевтические и диагностические функции как *in vitro*, так и *in vivo*.

На данный момент классифицируют два вида доставки активных веществ с помощью наночастиц – пассивная и активная адресная доставка. В отличие от здоровых клеток, микроокружение опухоли имеет микроциркуляцию с многочисленными крупными порами. Это происходит из-за усиленной потребности в кислороде и питательных веществах гиперпролиферирующими раковыми клетками называемой эффектом повышенной проницаемости и удержания (EPR) [2]. Именно этот эффект лежит в основе пассивной адресной доставки. Для активной адресной доставки характерно наличие адресной метки на поверхности частицы, которая будет связываться с поверхностным рецептором на раковой клетке.

Рецептор HER2 – мембранный белок, тирозинкиназа семейства рецепторов эпидермального фактора роста, которая сверхэкспрессируется на раковых клетках в 20–30% опухолей молочной железы и яичников. В нормальных клетках экспрессия этого белка низкая или отсутствует, что делает его удобной мишенью для доставки противораковых препаратов [3].

В данной работе рецептор HER2 был выбран как мишень для создания нацеленных частиц. В качестве биоразлагаемой и нетоксичной основы для наночастиц использовали полимер полилактид-ко-гликолид (PLGA), в структуру которого загружали два красителя – бенгальский розовый (Rose Bengal, RB) и нильский голубой (Nile Blue, NB).

В данной структуре наночастицы RB выступает как цитотоксическое вещество, вырабатывающее активные формы кислорода (при облучении зеленым светом), а NB как агент для визуализации (при облучении красным светом) раковых клеток *in vitro* и *in vivo*. Для адресной доставки частиц к раковым клеткам использовали моноклональное антитело – трастузумаб, применяемое для лечения рака молочной железы и одобренное FDA.

Методом двойной эмульсии были синтезированы адресные наночастицы, модифицированные анти-HER2 антителом, без использования химической конъюгации с антителом, с высокой эффективностью загруженные диагностическими и терапевтическими веществами

Специфическое связывание адресных частиц с HER2-сверхэкспрессирующими раковыми клетками BTNLuc исследовали методом проточной цитометрии. Визуализация частиц была продемонстрирована на клетках BTNLuc с использованием конфокальной микроскопии. Было показано, что частицы флуоресцируют только внутри клетки (что связано с липофильным микроокружением красителей внутри клетки) (Рис. 1). Флуоресценция частиц сохраняется в течение длительного времени, что было продемонстрировано в биоткани при исследовании интенсивности флуоресценции.

Таким образом, в ходе данного исследования были получены HER2-распознающие наночастицы PLGA, обладающими диагностическими (при облучении светом в ИК-диапазоне) и терапевтическими (при облучении 530 нм) свойствами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ 17-74-20146.

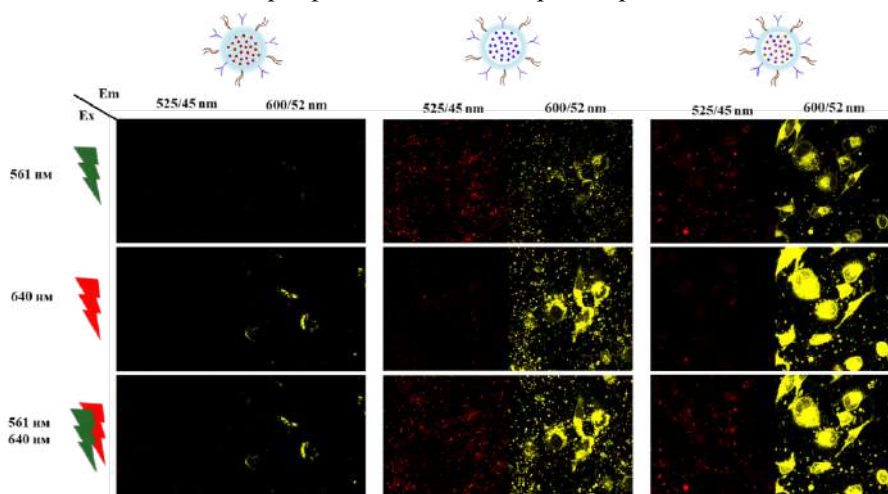


Рис. 1. Визуализация взаимодействия адресных наночастиц с клетками BTNLuc методом конфокальной микроскопии при облучении светом разной длины волны – лазерами 561 и 640 нм. Слева – частицы, загруженные RB; в центре – частицы, загруженные NB; справа – комбинированные частицы – RB+NB. Частицы интенсивно флуоресцируют только внутри клеток при облучении, как только 561 нм, так и 640 нм лазерами при загрузке обоими красителями.

Литература

1. Chidambaram M, Manavalan R, Kathiresan K. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations // J Pharm Pharm Sci. 2011;14(1):67-77
2. Jyoti Ahlawat, Gabriela Henriquez, and Mahesh Narayan. Enhancing the Delivery of Chemotherapeutics: Role of Biodegradable Polymeric Nanoparticles // Molecules. 2018 Aug 27;23(9).
3. O. N. Shilova, G. M. Proshkina, E. N. Lebedenko, and S. M. Deyev. Internalization and Recycling of the HER2 Receptor on Human Breast Adenocarcinoma Cells Treated with Targeted Phototoxic Protein DARPiniSOG // Acta Naturae. 2015 Jul-Sep; 7(3): 126–132.

УДК 620.3

Active compounds extracted from *Hermetia illucens* larvae fat inhibit phytopathogenic bacteria

H. Mohamed¹, E. Marusich¹, Y. Afanasev¹, I. Bendik¹, S. Leonov^{1,2}

¹Moscow Institute of Physics and Technology

²Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences

Bacterial phytopathogens are among the most important causal agents of plant diseases, with a negatively increased economic impact on crop production. Phytopathogens affect all food-producing plants colonizing either their surface or tissues [1]. They cause symptoms such as spots, blights, cankers, tissue rots, and/or hormone imbalances that lead to the plant overgrowth, stunting, root branching, and leaf epinasty [1,2]. However, the control of diseases caused by the pathogens listed above is difficult due to the limited efficacy of existed biological or chemical agents and the resistance to antibiotics long-term overuse [3]. It is worth stressing that, at present, there are no methods able to eradicate post-infection besides the

only preventive measures, which are commonly applied to limit or eliminate their further prevalence. Persistent infection increases the levels of morbidity and mortality globally and are an essential cause of plants' recurrent infective diseases. This might also be a prime reason for the crop disease outbreaks and recurrence, even with the frequent use of antimicrobial compounds and other management methods in the field.

Antimicrobial compounds of natural origin stand up as frontiers in the attempts of the overused antibiotics replacement. *H. illucens* larvae of Black Soldier Fly (BSFL) consist of 15% to 49% of fat, providing a rich source of lipids. This study aimed to develop a new procedure to enable effective extraction of biologically active ingredients from larvae fat via modified acidic water-methanol solution (AWM) and to demonstrate in vitro the antibacterial activity of this extract (AWME) against five crucial plant pathogenic bacteria *Xanthomonas campestris* subsp. *Campestris* (Xcc), *Pantoea agglomerans* (Pagg), *Dickeya solani* (Dsol), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) and *Pectobacterium atrosepticum* (Pba). To our knowledge, the *H. illucens* larvae fat never used before as a natural source for this extraction. This study addresses the urgent needs of new antibacterial agents for agriculture crop protection. Here, we present the first study on *H. illucens* larvae fat of as a source bioactive compounds effective against phytopathogens.

Fat was isolated from alive *Hermetia illucens* larvae of 15 days old by using a mechanical pressing machine and provided by the company NordTechSad, LLC (Arkhangelsk, Russia), and used for this study. All experiments were performed with fat from BSFL under the sterile condition at room temperature. Our extract prepared by mixing of the BSFL fat with the acidic water-methanol solution (Water: Me-OH: HCl) with ratio (90:9:1 %) for 5 min with subsequent shaking for 24h at room temperature. The mixture was centrifuged at 4200 ×g for 20 minutes, then the supernatant withdrawn by a sterile syringe. Finally, supernatant extract (AWME) concentrated under vacuum at 45 °C and kept at 4 °C until use. Antimicrobial properties of our AWME evaluated by disc assay, minimum inhibition concentration (MIC), IC₅₀, and minimum bactericidal concentration (MBC) against phytopathogens.

AWME effectively inhibited the bacterial growth for all tested Xcc, Pagg, Dsol, Pcc, and Pba pathogenic bacteria. The AWME suppressed the growth of all phytopathogens in a dose-dependent manner in the range of 50 to 3.13 mg/mL of tested concentrations. Thus, the Pagg and Dsol strains were the most susceptible during 12 h of incubation to AWME treatment at a minimal 3.13 mg/mL of its concentration. In contrast, for all other strains, the same effect was observed at 12.5 mg/mL of AWME concentration. The bacteria susceptibility to the AWME treatment decreased after 24 h of bacteria growth, compared with 12 h as shown in figure 1. The actual IZD size due to AWME treatment demonstrated a significant difference in comparison to Positive control at **** P < 0.0001. TB assay results demonstrated the increase of the AWME antimicrobial efficacy in a concentration-dependent manner, similar to the one observed from the agar disk diffusion assay. The minimum inhibitory concentration (MIC) value was 0.78 mg/mL for all tested phytopathogens. In comparison, MIC for the positive control penicillin-streptomycin was 3.13 U/mL-μg/mL for all strains, except Xcc, which was 6.25 U/mL-μg/mL. The minimum bactericidal concentration (MBC), which kills 99.9% of the bacteria, indicates the antimicrobial potency of AWME. MBC of AWME was 0.78 mg/mL for all phytopathogenic strains except Pagg, which was the less susceptible to AMWE with MBC 1.56 mg/mL. MBC of the positive control (P/S) was 6.25 U/mL-μg/mL only for Xcc strain and 3.125 U/mL-μg/mL for all other strains. The IC₅₀ values indicated the highest resistance of *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* strain to AWME and standard positive control (P/S) treatments as early as 6 h post-infection (535.1 ± 0.16 μg/mL and 0.1941 ± 0.15 μg/mL, respectively).

In summary, our newly developed extraction solution and the extraction procedure revealed that fatty acids and its derivatives of *H. illucens* larvae AWME fat dose-dependently inhibited the growth and proliferation of plant pathogenic Gram-negative bacteria such as *Xanthomonas campestris* subsp. *Campestris* *Pantoea agglomerans*, *Dickeya solani* *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*, and *Pectobacterium atrosepticum*. The present study also demonstrated the potential of *H. illucens* larvae fat to be used for the future development of novel and effective natural disinfectant(s) and/or antibacterial agent(s).

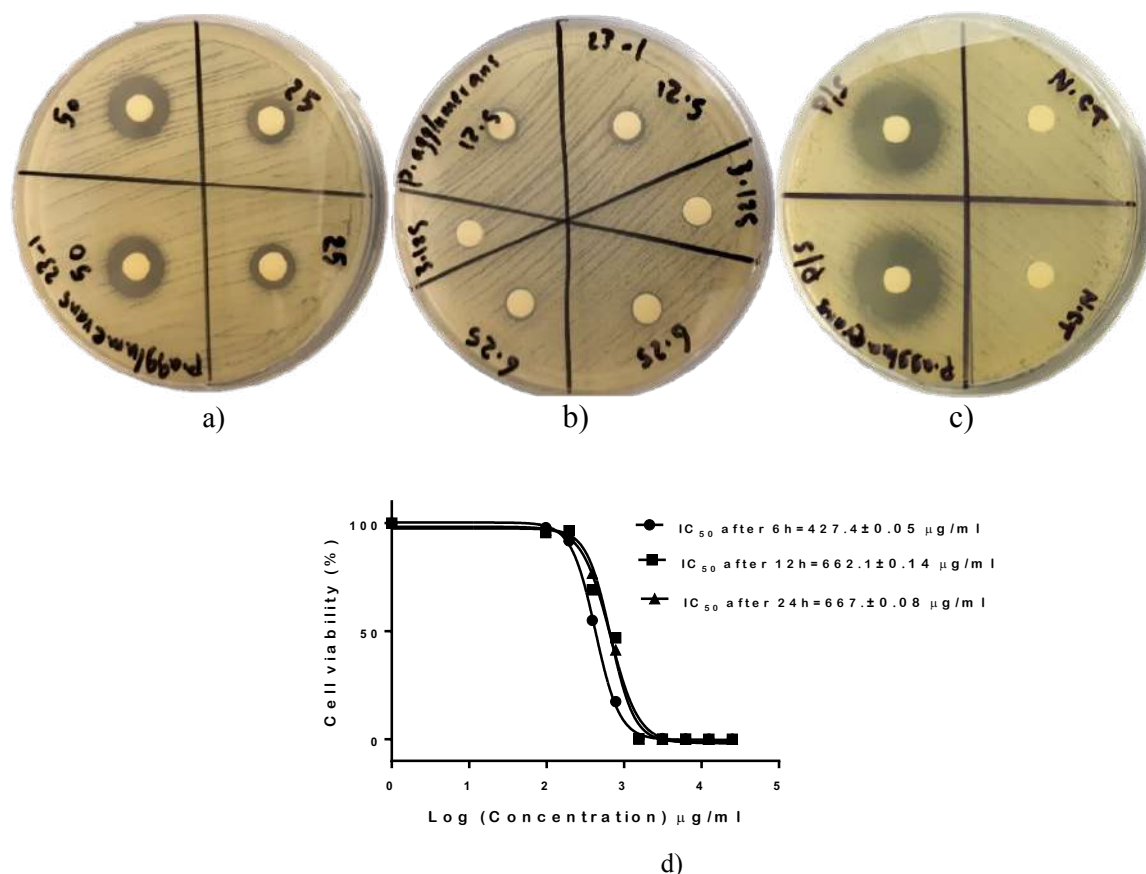


Fig. 1: Antimicrobial properties of AWME against phytopathogenic bacteria, (a & b) represent the disc assay at various concentrations of AWME (3.13-50 mg/ml), (c) positive and negative control, while (d) represent the IC₅₀ by non-linear regression curve obtained by graph pad prism 6. All values are the mean ± SD and SEM for three different independent experiments for IZD and IC₅₀, respectively.

References

1. Kannan, V.; Bastas, K.; Devi, R. Scientific and Economic Impact of Plant Pathogenic Bacteria. In Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria; Kannan, V., Bastas, K., Devi, R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2015; pp. 369–392.
2. Strange, R.N.; Scott, P.R. Plant Disease: A Threat to Global Food Security. Annu. Rev. Phytopathol. 2005, 43, 83–116.
3. Czajkowski, R.; Pérombelon, M.C.M.; Van Veen, J.A.; Van der Wolf, J.M. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: A review. Plant Pathol. 2011, 60, 999–1013

УДК 615.461

Бактерицидный порошковый материал медицинского назначения

Ю. А. Новиченко, Л. А. Леонова

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

В настоящее время активно ведутся исследования многофункциональных композитных материалов, в том числе для медицинских целей. Особое внимание уделяется материалам с наночастицами серебра. Серебро в ионном виде обладает бактерицидным, выраженным противогрибковым и антисептическим действием и служит высокоэффективным обеззараживающим средством в отношении патогенных микроорганизмов, вызывающих острые инфекции [1].

В связи с тем, что воспаления возникают как в мягких, так и в костных тканях, существует необходимость в создании материала, который бы способствовал одновременному восстановлению костной ткани (сращиванию) и ликвидации патогенных микроорганизмов, способствующих возникновению воспаления. Благодаря объединению антибактериальных свойств серебра и биоактивных

свойств гидроксиапатита возможно создание биосовместимой матрицы с осажденными каталитически активными частицами металла. В связи с этим целью данной работы является синтез гидроксиапатита со специальными свойствами.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- Проанализировать литературные данные и методики получения серебро-замещенного гидроксиапатита;
- Провести теоретическое обоснование, с помощью термодинамических расчетов, возможности синтеза;
- Синтезировать серебро-замещенный гидроксиапатит.

Для детального исследования синтеза материала были выбраны две методики получения серебро-замещенного гидроксиапатита (контролируемого осаждения в водной фазе) для возможности сравнения полноты протекания процесса и получения конечного продукта.

Согласно первой методике оксид кальция необходимо смешать с водой до образования гидроксида. Полученный гидроксид кальция смешивается с гидрофосфатом аммония для образования гидроксиапатита. Далее в гидроксиапатит с избытком добавляется нитрат серебра для замещения катионов кальция на катионы серебра [2].

По второму способу получения гидроксиапатита к оксиду кальция добавляется азотная кислота для образования нитрата кальция. Далее полученный нитрат смешивается с гидрофосфатом аммония и нитратом серебра. В полученную смесь вводится гидроксид аммония, для осаждения серебро-замещенного гидроксиапатита [3]. Далее осадки прокаливались при 900 °С в течении 2 часов в керамическом тигле, в муфельной печи.

Для идентификации полученных порошков использовали метод инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием. При анализе ИК-спектров синтезированных образцов в сравнении с ИК спектром стандарта (естественного гидроксиапатита) были определены характерные пики для фосфатных и гидроксильных групп, что указывает на идентичность натуральному материалу.

Для качественного определения серебра в полученных образцах применялся метод рентгенофлуоресцентного анализа. Он позволил выявить содержание частиц серебра в полученных образцах (синтезированных по двум методикам), что свидетельствует о полноценном протекании процесса и достижении поставленных задач.

Дальнейшая работа в исследовании процесса получения серебро-замещенного гидроксиапатита будет связана с корректировкой технологии и оптимизацией условий синтеза. А также посвящена изучению бактерицидных свойств порошкового материала.

Литература

1. Букина Ю.А. Получение антибактериальных текстильных материалов на основе наночастиц серебра посредством модификации поверхности текстиля неравновесной низкотемпературной плазмой // Вестник Казанского технологического университета. 2012. № 7. С. 125 – 128.
2. Голощапов Д.Л. и др. Получение нанокристаллического гидроксиапатита методом химического осаждения с использованием биогенного источника кальция // Конденсированные среды и межфазные границы. 2011. № 4, С. 427-441.
3. Фадеев И.В. и др. Цинк- и серебросодержащий гидроксиапатиты: синтез и свойства // Химическая технология. 2012. Том 442, № 6, 780-783.

УДК 620.3

Биосовместимые наночастицы Ge, полученные методом фемтосекундной лазерной абляции

Я.Б. Беляев^{1,2}, И.В. Зеленикин^{1,2}, С.М. Деев^{1,2}

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

² Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

Наночастицы германия являются перспективными материалами для использования в биомедицине (1). Исследование биосовместимости наноматериалов необходимо на пути их эффективного использования *in vivo*. Нами были синтезированы наночастицы Ge и показана их резкая и долговременная токсичность.

Для синтеза наночастиц использовался метод фемтосекундной лазерной абляции (Yb:KGW лазер, 1030 нм, 270 фс, 30 мкДж, 100 кГц), что позволило без использования токсичных реагентов получить частицы чистого кристаллического вещества. С помощью измерения динамического светорассеяния был определен размер частиц: (100 ± 25) нм). Потенциал кинетического слоя составил (-40 ± 5) мВ). Наночастицы были инкубированы в сыворотке крови, что позволило повысить их коллоидную стабильность в натрий-фосфатном буфере (рН=7.4).

Клеточная токсичность наночастиц Ge проверялась на эритроцитах. Было показано, что они не вызывают гемолиза и гемагглютинации. Для определения *in vivo* токсичности были проведены гистологические исследования, биохимических тесты крови и измерения массы животных после введения частиц в различные периоды времени. В течение месяца после введения в дозах до 50 мг/кг частицы не оказали токсического влияния на организм.

Таким образом, наночастицы Ge, полученные методом фемтосекундной лазерной абляции, обладают низкой токсичностью и могут быть использованы в биомедицинских целях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-72-30012.

Литература

1. Rodio M. *et al.* Tailoring of size, emission and surface chemistry of germanium nanoparticles via liquid-phase picosecond laser ablation //Journal of Materials Chemistry C. – 2017. – Т. 5. – №. 46. – С. 12264-12271.

УДК 620.3

Блокировка макрофагов наночастицами *in vivo* в различных иммунных состояниях

А.Б. Миркасымов^{1,2}, И.В. Зеленукин^{1,2,3}, П.И. Никитин^{3,4}, М.П. Никитин^{1,2,4}, С.М. Деев^{1,3}

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

³Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ

⁴Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН

Применение нанотехнологий в медицине позволяет уменьшить токсичность традиционных химиопрепаратов для лечения злокачественных опухолей. Более того, использование различных материалов, например, с оптическими или магнитными свойствами, а также нацеливающих лигандов позволяет разрабатывать всевозможные умные тераностические агенты. Одной из ключевых проблем, ограничивающих эффективность таких наночастиц, является их быстрое узнавание и поглощение системой мононуклеарных фагоцитов (СМФ), в основном макрофагами печени и селезенки [1]. Временное ингибирование способности макрофагов к фагоцитозу посредством больших доз малотоксичных нефункциональных наночастиц (СМФ блокада) позволяет в разы продлить циркуляцию терапевтических наноагентов в кровотоке и улучшить их действенность [2].

В этой работе мы изучаем эффективность применения метода СМФ блокады в *in vivo* модели, симулирующей острую воспалительную реакцию, вызванную внутривенным введением липополисахарида *Escherichia coli*, а также в модели организма, обремененного развитием злокачественной опухоли (меланома B16-F1, рак молочной железы EMT6/P). Кроме того, мы показываем применимость метода для продления циркуляции наночастиц различного размера.

Исследование проводилось на библиотеке наночастиц из оксида кремния, синтезированных по методу, основанному на процессе Штобера [3]. Магнитная метка, встроенная в частицы, позволила в реальном времени неинвазивно измерять концентрацию наночастиц в кровотоке животного, используя МРQ-технологии [4].

Применение субмикронных наночастиц из оксида кремния в качестве блокаторов макрофагов увеличивало время циркуляции магнитных наночастиц (МЧ) в крови в среднем в 3 раза. При этом различия в эффективности метода при сравнении модели здорового организма и вышеперечисленных патологий были во многом связаны с сокращением или наоборот продлением циркуляции МЧ в отсутствие блокады.

Таким образом, результаты работы доказывают действенность метода СМФ блокады как в здоровом, так и в патологическом состоянии организма, демонстрируют универсальность метода для продления частиц различной величины и показывают практическую значимость данной технологии для наномедицины.

Литература

1. Zhang YN, Poon W, Tavares AJ, McGilvray ID, Chan WC. Nanoparticle–liver interactions: cellular uptake and hepatobiliary elimination. *Journal of controlled release*. 2016 Oct 28; 240:332-48.
2. Liu T, Choi H, Zhou R, Chen IW. RES blockade: A strategy for boosting efficiency of nanoparticle drug. *Nano Today*. 2015 Feb 1;10(1):11-21.
3. Zelepukin IV, Shipunova VO, Mirkasymov AB, Nikitin PI, Nikitin MP, Deyev SM. Synthesis and Characterization of hybrid core-shell Fe₃O₄/SiO₂ nanoparticles for biomedical applications. *Acta Naturae* (англоязычная версия). 2017;9(4 (34)).
4. Zelepukin IV, Yaremenko AV, Yuryev MV, Mirkasymov AB, Sokolov IL, Deyev SM, Nikitin PI, Nikitin MP. Fast processes of nanoparticle blood clearance: Comprehensive study. *Journal of Controlled Release*. 2020 Oct 10; 326:181-91.

УДК 615.322

Виртуальный скрининг флавоноидов как ингибиторов папаиноподобной протеазы коронавируса SARS-CoV-2

А.Х. Тальдаев, У.С. Кенч, Р.П. Терехов, И.А. Селиванова

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский университет)

В связи с распространением новой коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2), особую важность приобретает проблема разработки новых препаратов для ее лечения. Потенциальной мишенью для дизайна противовирусных препаратов является папаиноподобная протеаза (PLpro), имеющая ключевое значение в жизни коронавируса в связи с участием в процессинге полипротеина. Перспективными объектами для разработки новых препаратов являются природные соединения флавоноиды, обладающие высоким профилем безопасности [1]. Цель исследования: оценить возможность флавоноидов ингибировать PLpro методом молекулярного докинга.

Структура белка, полученная методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.66 Å, была взята из PDB (PDB ID: 6WX4). Удаление молекул воды и лиганда, добавление парциальных зарядов по методу Гастейгера осуществляли в AutoDockTools версии 1.5.6 (TSRI, США). Геометрически корректные и ионизированные при физиологическом pH виртуальные структуры 45 флавоноидов были получены из базы данных ZINC (zinc.docking.org). Подготовку лигандов проводили в Raccoon | AutoDock VS версии 1.0 (TSRI, США). Виртуальный скрининг осуществляли в программе AutoDock Vina версии 1.1.2 (TSRI, США) [2]. Визуализацию проводили в программе Discovery Studio Visualizer версии 19.1.0.18287 (BIOVIA, США).

В качестве порога потенциальной активности флавоноида была выбрана величина скоринга -7,1 ккал/моль, отражающая обратимость белок-лигандного взаимодействия. Результаты виртуального скрининга были ранжированы по энергии аффинитета флавоноида к PLpro. Сопоставительный анализ результатов докинга показал, что увеличение числа гидроксильных групп в кольце А флавоновой структуры и увеличение размера молекулы приводит к росту энергии связывания. Из исследованных 45 флавоноидов соединением-лидером является процианидин В3 (скоринг -7,3 ккал/моль). Это соединение образует 6 водородных связей со следующими аминокислотными остатками PLpro: Leu 162, Tyr 264, Tyr 268, Gln 269, Tyr 273, Thr 301 (Рис. 1).

Таким образом, полученные результаты представляют интерес для рациональной разработки фитопрепаратов для комплексной терапии COVID-19. Необходимы дальнейшие исследования методом молекулярной динамики для подтверждения результатов виртуального скрининга, трансляции их в условиях *in vitro* и *in vivo*.

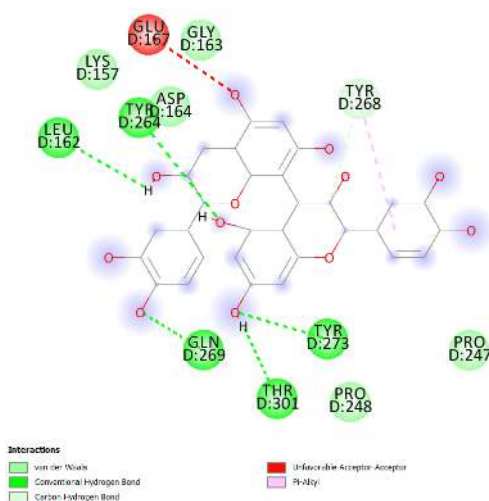


Рис. 1. Карта взаимодействий процианидина В3 с PLpro.

Литература

1. Schauss A.G., Tselyico S.S., Kuznetsova V.A., Yegorova I. Toxicological and Genotoxicity Assessment of a Dihydroquercetin-Rich Dahurian Larch Tree (*Larix gmelinii* Rupr) Extract (Lavitol) // *Int. J. Toxicol.* 2015. V. 34(2). P. 162.
2. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading // *J. Comput. Chem.* 2010. V. 31(2). P. 455.

УДК 541.1

Включение НПВС в металлоорганические каркасы на основе γ -циклодекстрина

А. Л. Смирнова^{1,2}, И. Л. Критский¹, И. В. Терехова¹

¹Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук

²Ивановский государственный университет

Эффективность лекарств может быть модифицирована без вмешательства в структуру молекулы путем применения различных систем доставки, с помощью которых можно не только изменить транспортные пути лекарственного соединения (ЛС), сделав его воздействие адресным, но защищать ЛС от преждевременной деструкции под действием метаболических процессов в живом организме [1]. Одним из новых направлений в фармацевтической химии является разработка систем доставки на основе пористых металлоорганических каркасов, построенных из биосовместимых γ -циклодекстрина и ионов калия [2]. Подобные структуры благодаря развитой системе наноразмерных пор способны инкапсулировать низкомолекулярные ЛС, приводя к повышению их растворимости и биодоступности [3].

В данной работе рассматривается ряд нестероидных противовоспалительных соединений: ибупрофен, кетопрофен, индометацин (рис. 1). НПВС различаются по своей структуре, активности, свойствам и специфике действия, следовательно, могут применяться в терапии различного вида заболеваний и проявлять жаропонижающий, болеутоляющий, противовоспалительный и др. эффекты.

Исследуемые НПВС обладают низкой растворимостью в водных средах [4-6], что ведет к снижению биодоступности при пероральном приеме и усилению побочных эффектов. Соответственно, актуальной задачей является поиск эффективных систем доставки этих лекарственных соединений. Цель данной работы состояла в изучении возможности включения НПВС в пористый металлоорганический каркас на основе γ -циклодекстрина (γ CD-MOF).

γ CD-MOF получен по модифицированной методике. В отличие от классического синтеза, описанного в литературе [2], был применен высокоэнергетический подход с применением ультразвука, что позволило получить однородные по дисперсности кристаллы γ CD-MOF, обладающие увеличенной на 30% удельной площадью поверхности, в сравнении с образцами, ранее полученными нами методом диффузии паров органического антирастворителя [3].

НПВС были загружены в γ CD-MOF методом соосаждения. Содержание активного компонента в композите γ CD-MOF/НПВС (таблица 1) определяли спектрофотометрически. Измерение

удельной площади поверхности чистого γ CD-MOF и композитов γ CD-MOF/НПВС (таблица 1) проводилось на приборе NOVAtouch NT LX, расчет производился по теории БЭТ. Рентгенофазовый анализ композитов был выполнен на дифрактометре D2 Phaser.

Показано, что НПВС могут быть иммобилизованы в γ CD-MOF. Наибольшее содержание ЛС в композите продемонстрировал ибупрофен, а наименьшее – индометацин. Предположительно это определяется геометрическими размерами молекул НПВС. Включение ибупрофена как менее объемного из рассматриваемых НПВС более предпочтительно. Удельная площадь поверхности металлоорганического каркаса уменьшается при встраивании в поры лекарственных соединений. Показано, что иммобилизация лекарственного соединения на металлоорганическом каркасе не отражается на его кристаллической структуре, что было показано из сравнения данных РФА исходного γ CD-MOF и композитов γ CD-MOF/НПВС. Молекулы НПВС в составе композита не включены в структуру каркаса, не составляют отдельной фазы и, предположительно, находятся в порах в аморфном состоянии.

Получение композитов НПВС с γ CD-MOF может в разы увеличить растворимость лекарственных средств, что важно при разработке водорастворимых форм.

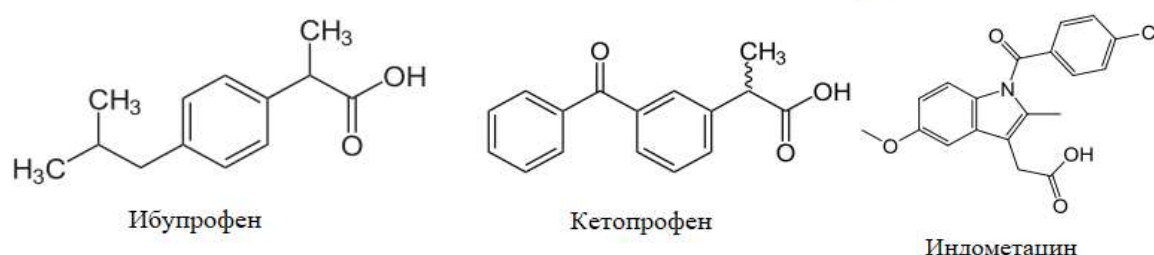


Рис. 1. Структурные формулы НПВС

Образец	Содержание ЛС (мас.%)	Удельная поверхность (м ² /г)
γ CD-MOF	0	896.2
γ CD-MOF/Ибупрофен	3.4	228.7
γ CD-MOF/Кетопрофен	1.9	248.5
γ CD-MOF/Индометацин	1.2	310.9

Таб. 1. Содержание НПВС в γ CD-MOF

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №18-29-04023).

Литература

1. Толстиков, А.Г., Толстиков Г.А., Толстикова Т.Г. На пути к низкодозным лекарствам // Вестник Российской академии наук. – 2007. – Т. 77, вып. 10. – С. 867 – 874.
2. Smaldone R.A., Forgan R.S., Furukawa H., Gassensmith J.J., Slawin A.M.Z., Yaghi O.M., Stoddart J.F. Metal-organic frameworks from edible natural products // Angewandte Chemie International Edition. – 2010. – V. 49. – №. 46. – P. 8630-8634.
3. Kritskiy I., Volkova T., Sapozhnikova T., Mazur A., Tolstoy P., Terekhova I. Methotrexate-loaded metal-organic frameworks on the basis of γ -cyclodextrin: Design, characterization, in vitro and in vivo investigation // Materials Science and Engineering: C. – 2020. – P. 110774.
4. Soltanpour S., Jouyban A. Solubility of Acetaminophen and Ibuprofen in Binary and Ternary Mixtures of Polyethylene Glycol 600, Ethanol and Water // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2010. – V. 58, № 2. – P. 219–224.
5. Gantiva M., Martínez F. Thermodynamic analysis of the solubility of ketoprofen in some propylene glycol+water cosolvent mixtures // Fluid Phase Equilibria. – 2010. – V. 293, № 2. – P. 242–250.
6. Lolli M.L., Carnovale I.M., Pippione A.C., Wahlgren W.Y., Bonanni D., Marini E., Boschi D. Bioisosteres of Indomethacin as Inhibitors of Aldo-Keto Reductase 1C3 (AKR1C3) // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2019. – V. 10, № 4. – P. 437 - 443.

Влияние ионов ртути на способность *Chlorella vulgaris* образовывать колонии клеток

А.А. Афонин, Е.Р. Ляпунова, Л.Н. Комарова

Обнинский институт атомной энергетики — филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

Загрязнение окружающей среды ртутью – одна из актуальных проблем современного мира, потому как сам металл, так и его производные являются высокотоксичными соединениями [1, 2]. В высоких концентрациях эти вещества могут оказывать быстрое и жесткое воздействие, как на организмы, так и экосистемы в целом. Проблема ртутного загрязнения актуальна даже для водных и наземных экосистем в непосредственной близости, от которых отсутствуют локальные источники загрязнения металлом [3, 4].

Целью работы являлась оценка влияния ионов на ртути на гидробионтов.

В качестве объекта исследований выбрана одноклеточная зелёная водоросль *Chlorella vulgaris*. Хлорелла – удобный объект биологического мониторинга состояния природных экологических систем, поскольку имеет широкий ареал распространения и присутствует как в водоемах, так и на почвах. Культивирование хлореллы проводили на 50% жидкой среде Тамия.

Воздействие оценивали по типам инактивации клеток методом микроколоний. Существует три формы инактивации:

- 1) М1 – микроколонии, состоящие из 10-40, а иногда и большего числа клеток;
- 2) М2 – микроколонии, содержащие 2-4 клетки;
- 3) М3 – одиночные клетки, т.е. гибель без деления [5].

Хлореллу выдерживали в растворах 1 ПДК (0,0005 мг/л) и 10 ПДК (0,005 мг/л) нитрата ртути (II) в течение 30 и 90 минут, после чего высевали на питательную среду. Эффект воздействия оценивали на следующие сутки.

Высокая чувствительность водоросли к содержанию ртути в среде наблюдалась уже в первые полчаса воздействия для обеих концентраций, затем ингибирование роста клеток продолжалось. Из рис. 1 видно, что воздействие ионов ртути в концентрации 1 ПДК снижает способность клеток к образованию колоний в 2 раза, а при концентрации в 10 ПДК – примерно в 4 раза, что, скорее всего, связано с быстрым поглощением ионов клетками. Дальнейшее воздействие продолжает угнетать образование колоний, что, видимо, связано с воздействием поглощенной ртути на внутриклеточные структуры и, соответственно, метаболизм, что приводит к подавлению роста численности клеток водоросли.

На рис. 2 видно, что при воздействии ртути в течение 30 мин в обеих концентрациях наблюдается сопоставимая гибель клеток, прошедших только одно деление. Дальнейшее воздействие снижает образование подобных клеток только в концентрации 1 ПДК, что связано с адаптацией к воздействию металла и переходом части клеток в тип М1, тогда как в концентрации 10 ПДК клетки теряют эту возможность.

Воздействие ионов ртути в обеих концентрациях повышает выход клеток, погибших без деления, что видно на рис. 3, причем при воздействии поллютанта в концентрации 10 ПДК в течение 90 минут этот показатель превышает 50%.

Гибель клеток без деления мы объясняем генотоксичностью ртути, что выражается в прямом взаимодействии ионов ртути с тубулином и кинезином – белками цитоскелетных микротрубочек, что негативно влияет на внутриклеточную подвижность, транспорт и вызывает неправильное расхождение хромосом при делении клеток [6].

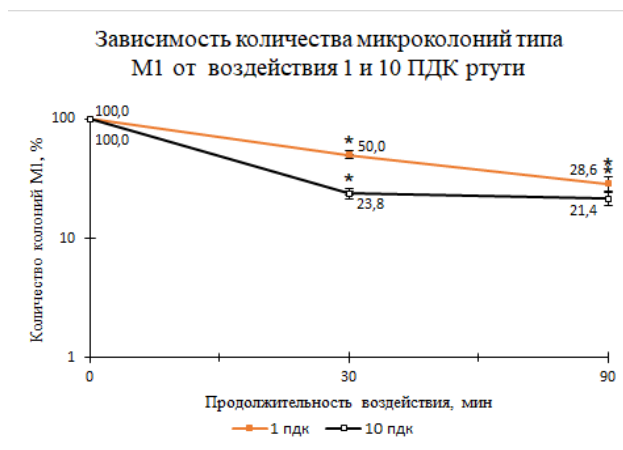


Рис. 1 Зависимость количества образованных микроколоний типа M1 от времени воздействия ионов ртути 1 ПДК (0,0005 мг/л) и 10 ПДК (0,005 мг/л)
*P < 0,050 – тест Манна-Уитни

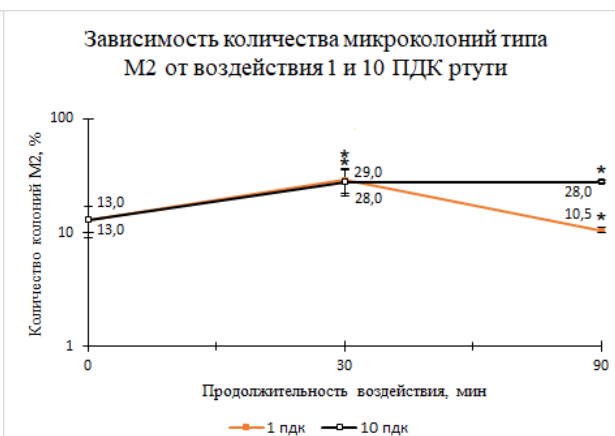


Рис. 2. Зависимость количества образованных микроколоний типа M2 от времени воздействия ионов ртути 1 ПДК (0,0005 мг/л) и 10 ПДК (0,005 мг/л)
*P < 0,050 – тест Манна-Уитни

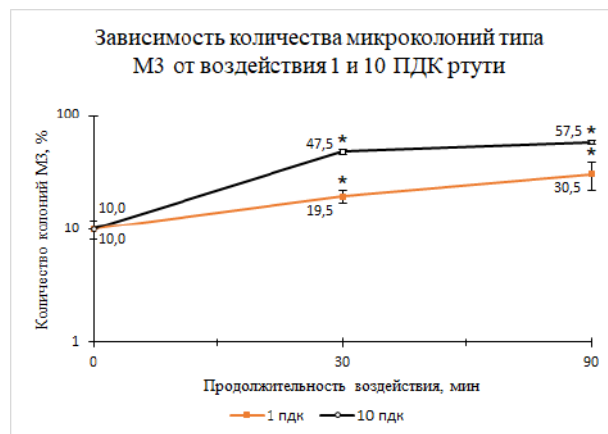


Рис. 3. Зависимость количества образованных микроколоний типа M3 от времени воздействия ионов ртути 1 ПДК (0,0005 мг/л) и 10 ПДК (0,005 мг/л)
*P < 0,050 – тест Манна-Уитни

Литература

1. Кубракова М.Е. Влияние металлоорганических соединений ртути на состояние мембран клеток // Фундаментальные исследования. 2006. №9. С.8.
2. Bertrand M., Poirier I. Photosynthetic organisms and excess of metals // Photosynthetica. 2005. V.43. №3. P.345–353.
3. Шувырденков И.А., Гремячих В.А., Заринов, В.Н. Предварительные данные по содержанию ртути в органах и тканях некоторых видов рыб и млекопитающих Ивановской области // Ртуть и другие тяжелые металлы в экосистемах. Современные методы исследования содержания тяжелых металлов в окружающей среде. 2018. С.72-73.
4. Berzas Nevado J.J. [et al.] Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: A review / J.J. Berzas Nevado, R. C. Rodríguez Martín-Doimeadios, F.J. Guzmán Bernardo, M. Jiménez Moreno, A.M. Herculano, J. L. M. do Nascimento, M. E. Crespo-López // Environment International, 2010. 36: 593-608.
5. Капульцевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г. Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток // Радиобиология. 1972. Т. 12, № 2. С.267-274.
6. Bonacker D. [et al.] Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function / D. Bonacker, T. Stoiber, M. Wang, I. Prots, E. Unger, R. Thier, H.M. Bolt, G.H. Degen// Archives of Toxicology. 2004. V.78. №10. P.575–583.

Влияние нуклеотидной последовательности фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов на их гибридизационные свойства и структуру дуплексов

А. С. Шторк

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)
Новосибирский государственный университет (национальный исследовательский университет)
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

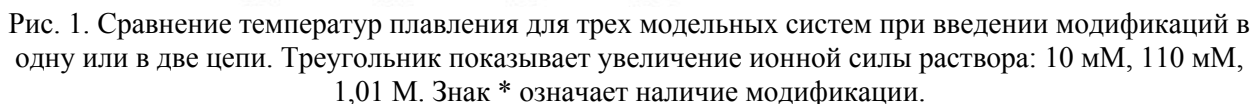
Олигонуклеотиды в настоящее время широко используются в молекулярно-биологических исследованиях в качестве элементов систем генетического анализа и терапевтических агентов [1]. Использование фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (ФГО), впервые синтезированных в ИХБФМ СО РАН, выглядит особо перспективным, благодаря их полезным свойствам. К таким свойствам можно отнести их умение специфично связываться с комплементарными цепями нуклеиновых кислот, способность проникать через клеточную мембрану, устойчивость к действию нуклеаз, а также возможность их автоматического синтеза [2, 3]. Гибридизационные свойства ФГО существенно отличаются от свойств нативных олигонуклеотидов, что требует их детального изучения с целью эффективного дизайна их структур для вышеперечисленных применений.

Целью данной работы является исследование влияния нуклеотидного состава ФГО на их гибридизационные свойства и структуру их дуплексов при различных ионных силах раствора. В качестве модельных мы выбрали следующие комплементарные комплексы олигонуклеотидов: d(AAGAGAGAGG)/d(CCTCTCTCTT), d(GAAAAAAAAAAC)/d(GTTTTTTTTTTC) и d(GCGCCAAACA)/d(TGTTTGCGGC) с полностью нативными, одной нативной и одной модифицированной и полностью модифицированными цепями.

Исследования структуры комплексов ФГО проводились методом кругового дихроизма (КД). Было показано, что температурные КД-спектры ФГО имеют ту же форму, что и для нативных олигонуклеотидов, и это говорит о том, что введение модификации не приводит к изменению типа структурной укладки двойной спирали. При этом, амплитуда сигнала ФГО меньше, чем для нативных олигонуклеотидов, что свидетельствует об увеличении их конформационной подвижности. Предположительно, это является следствием отсутствия отрицательного заряда у ФГО и, соответственно, отсутствия электростатического отталкивания между цепями.

Исследования гибридизационных свойств модельных олигонуклеотидов мы проводили методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. С помощью анализа кривых плавления мы проверили применимость модели двух состояний для ФГО-комплексов. Далее, методом оптимизации кривых термической денатурации, мы получили величины термодинамических параметров формирования комплексов в приближении модели двух состояний при различной ионной силе раствора. Мы показали, что модифицированные комплексы всех трех модельных систем обладают повышенной термостабильностью по сравнению с нативными комплексами при низкой ионной силе (рис. 1). Температура плавления комплексов

с одной ФГО-цепью зависит от того, в какую из двух цепей мы вводим модификацию. Таким образом, наблюдается ярко выраженная зависимость термостабильности от нуклеотидного состава. Зависимость термостабильности от ионной силы раствора наиболее явно наблюдается для нативных олигонуклеотидов, что объясняется экранированием катионами соли отрицательного заряда нативных дуплексов и, как следствие, понижением электростатического отталкивания между цепями. В случае модифицированных цепей, ввиду отсутствия отрицательного заряда у ФГО, данный эффект не наблюдается. Анализ зависимостей термостабильности от ионной силы раствора для комплексов, содержащих ФГО, показывает отсутствие общих закономерностей для модельных систем с разным нуклеотидным составом.



1. Патутина О.А. и др. Новейшие подходы к лечению онкологических заболеваний: противоопухолевые препараты на основе ген-направленных нуклеиновых кислот // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2009. – Т. 1. – № 2.
2. Pyshnaya I.A. et al. The Influence of the Non-Nucleotide Insert on the Hybridization Properties of Oligonucleotides // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2004. Т. 23. №. 6-7. С. 1065-1071
3. Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2014. Т. 6. №. 4 (23).

Влияние рекомбинантного белка Slurp-1 на рост и миграцию клеток первичных линий меланомы

³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

87

проводились на низкодифференцированных клеточных линиях: mel Cher, mel Gi, mel Kor, mel H и умереннодифференцированной линии меланомы mel P.

При помощи ПЦР в реальном времени было показано, что все исследуемые линии экспрессируют ген *SLURP-1*, гены структурных гомологов *SLURP-1* *SLURP-2* и *LYNX1*, а также гены, кодирующие $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ субъединицы nAChR и ген *CHRFAM*, гибрид гена *CHRNA7* и гена *FAM*, модулирующий работу $\alpha 7$ -nAChR. Наибольшая экспрессия *CHRNA7* наблюдается в клетках mel H, mel Kor и mel Cher, в этих же линиях экспрессируется наибольшее количество *SLURP-1* (Рис. 1). Следует отметить, что уровень экспрессии *CHRNA7* в клетках mel Kor mel H сопоставим с уровнем экспрессии гена *CHRFAM*. Для определения влияния rSLURP-1 на рост первичных клеток меланомы использовался тест на активность митохондриальных редуктаз WST-1. Обнаружено, что rSLURP-1 не влияет на пролиферацию клеток mel Kor, mel Cher, mel Gi и mel P (Рис. 2), но тормозит рост клеток mel H до ~ 50 % относительно контроля при 48-часовой инкубации (Рис. 3А).

Известно, что потребление никотина способствует прогрессии многих типов опухолей [1], поэтому нами было изучено влияние никотина на рост клеток mel H. Мы установили, что 100 нМ никотина увеличивает количество клеток mel H на ~ 30% при 72-часовой инкубации (Рис. 3Б), более того при постоянном культивировании клеток mel H с 100 нМ никотина, на поверхности клеток увеличивается уровень экспрессии $\alpha 7$ -nAChR (Рис. 3В). rSLURP-1 ингибировал пролиферацию клеток mel H, культивируемых с 100 нМ никотина, до ~ 55 % относительно необработанных rSLURP-1 клеток (Рис. 3Г). Полученные данные свидетельствуют о том, что rSLURP-1 сохраняет антипролиферативный эффект даже при постоянном культивировании клеток mel H с 100 нМ никотина. Для определения мишени действия rSLURP-1 в клетках mel H, была проанализирована локализация функционально-активного $\alpha 7$ -nAChR и флуоресцентно-меченного rSLURP-1 в данных клетках. Конфокальная микроскопия выявила частичную со-локализацию флуоресцентно-меченного rSLURP-1 с $\alpha 7$ -nAChR, окрашенным специфическим ингибитором α -бунгаротоксином, на поверхности клеток mel H.

Таким образом, нами впервые показано, что rSLURP-1 тормозит рост первичных клеток меланомы mel H при взаимодействии с $\alpha 7$ -nAChR, при этом антипролиферативный эффект препарата сохраняется даже при культивировании клеток с никотином.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№17-74-20161).

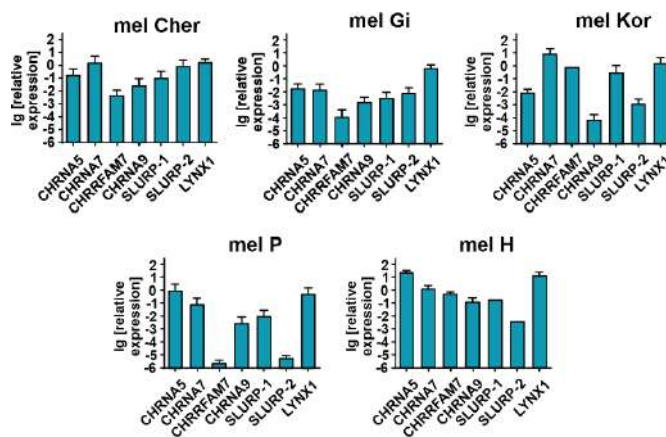


Рис. 1. Анализ экспрессии субъединиц nAChR и трехпетельных модуляторов nAChR в первичных клетках меланом посредством ПЦР в реальном времени (n=5-6).

Экспрессия целевых генов нормировалась на экспрессию генов домашнего хозяйства *ACTB*, *RPL13a*.

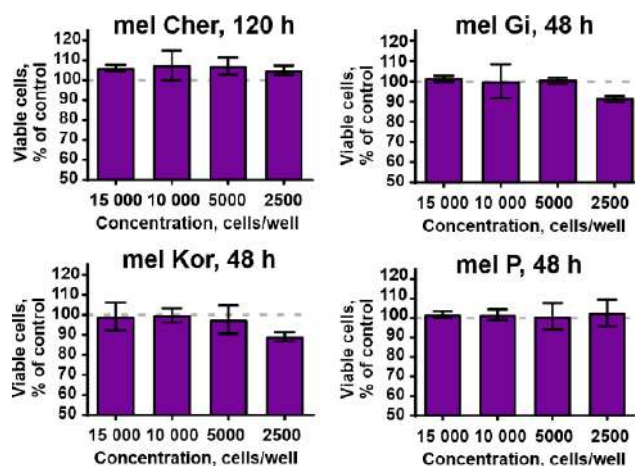


Рис. 2. Влияние rSLURP-1 на жизнеспособность клеток: mel Cher, mel Kor, mel Gi, mel P (n = 3-4). One-way ANOVA тест с последующим Dunnett's тестом не выявил достоверных отличий количества контрольных и обработанных клеток не выявлено.

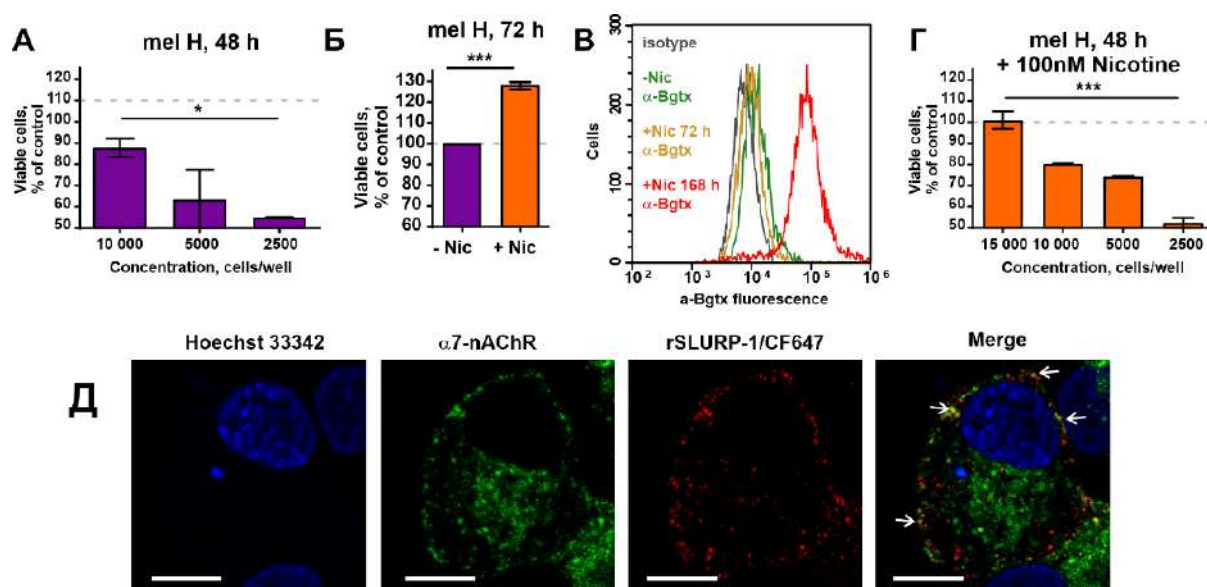


Рис. 3. Влияние rSLURP-1 на жизнеспособность клеток mel H. А - влияние Slurp-1 на жизнеспособность клеток mel H при 48-часовой инкубации (n=2). Б - влияние никотина на пролиферацию клеток mel H при 72 ч инкубации (n=2). В - анализ экспрессии функциональных $\alpha 7$ -nAChR в норме и при инкубации с 100 nM никотином. Г - влияние Slurp-1 на жизнеспособность клеток mel H, культивируемых при добавлении 100 nM никотина (n=2). Д - анализ локализации $\alpha 7$ -nAChR и флуоресцентно-меченного rSLURP-1 (rSLURP-1/CF647) посредством конфокальной микроскопии. Шкала = 10 мкм. Стрелки указывают на места со-локализации $\alpha 7$ -nAChR.

Литература

1. Shulepko M.A., Kulbatskii D.S., Bychkov M.L., Lyukmanova E.N. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. № 2. P. 66–75.
2. Bergqvist C., Kadara H., Hamie L., Nemer G., Safi R., Karouni M., Marrouche N., Abbas O., Hasbani D.J., Kibbi A.G., et al. // International Journal of Dermatology. 2018. V. 57. № 2. P. 162–170.
3. Lyukmanova E., Bychkov M., Sharonov G., Efremenko A., Shulepko M., Kulbatskii D., Shenkarev Z., Feofanov A., Dolgikh D., Kirpichnikov M. // British Journal of Pharmacology. 2018. V. 175. № 11. P. 1973–1986.
4. Shulepko, M.A., Bychkov M. L., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P. // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2020. P. accepted.

Детонационные наноалмазы: возможность применения в препаратах фотодинамической терапии

Д.С. Черечукин¹, Ю.В. Кульвелис², В.Т. Лебедев²

¹Санкт-Петербургский государственный университет

²Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального Исследовательского центра «Курчатовский институт»

Детонационные наноалмазы (ДНА), ставшие коммерчески доступными по цене и количеству только в последние годы, привлекают большое внимание возможностью их применения в современной медицине как биоинертные и однородные по размеру наночастицы. Прежде всего, это связано с доступностью для химической модификации их поверхности, где при детонационном синтезе формируются функциональные группы. В настоящее время показано применение ДНА в качестве носителей лекарственных препаратов и биомаркеров [1, 2]. Одной из проблем практического применения ДНА для медицинских целей остается агрегация этих наночастиц в водных средах и нестабильность водных суспензий ДНА.

В данной работе были исследованы водные растворы комплексов ДНА с биосовместимым синтетическим полимером поливинилпирролидоном (ПВП, ММ=10³), а также тройных комплексов - ПВП-ДНА-е6, где е6 – хлорин е6 является основным компонентом фотосенсибилизатора Радахлорина[®], применяющегося в современной фотодинамической терапии некоторых онкологических заболеваний. Методами гидродинамики и динамического светорассеяния определяли условия стабильности комплексов; спектральными методами - влияние ДНА и ПВП на свойства хлорина е6.

Изучение спектров люминесценции комплексов показало, что ПВП повышает интенсивность люминесценции е6 при УФ-возбуждении на длине волны 405 нм и генерацию синглетного кислорода в растворе. Также было показано, что ДНА в комплексе с ПВП и е6 способны передавать энергию возбуждения на окружающие их молекулы и усиливать люминесценцию синглетного кислорода. Обнаруженные явления позволяют существенно снизить терапевтическую дозу Радахлорина[®] за счет применения комплексов ПВП-е6 и ПВП-ДНА-е6 вместо чистого препарата, уменьшая, таким образом, его токсичность.

Спектральные исследования были проведены в Ресурсном центре «Оптические и лазерные методы исследования вещества» Санкт-Петербургского государственного университета.

Работа поддержана РФФИ (грант № 18-29-19008)

Литература

1. *Chen M., Pierstorff E., Lam R., Li Sh.-Y., Huang H., Osawa E., Ho D.* Nanodiamond-Mediated Delivery of Water-Insoluble Therapeutics // ACSNano. 2009. Vol. 3(7). P. 2016-2022
2. *Bradac C., Das Rastog I., Cordina N., Garcia-Bennett A., Brown L.* Influence of surface composition on the colloidal stability of ultra-small detonation nanodiamonds in biological media // Diamond & Related Material. 2018. Vol. 83. P. 38-45.

Изучение биологической деградации наноструктурированных полимерных материалов

А.А.Мельникова, В.А. Орехова, Л.Н. Комарова

Обнинский институт атомной энергетики (ИАТЭ НИЯУ МИФИ)

В связи с ежегодно возрастающим объемом производства полимерных материалов актуальным направлением является использование композиционных материалов с установленным сроком службы и способностью сохранения эксплуатационных свойств в течение периода их использования, с последующей деструкцией в условиях окружающей среды без образования токсичных веществ.

Целью настоящей работы было изучение биологической деградации наноструктурированного композиционного материала с использованием слоистого природного минерала из класса метасиликатов.

Биодеградируемый полимерный композиционный материал представляет собой смешанную многокомпонентную систему, обеспечивающую биоразлагаемость всей системы. Как правило, композитная система состоит из матрицы и армирующей фазы волокон, органических или минеральных наполнителей (рис. 1). В качестве матрицы может быть выбран практически любой материал: полимер, металл, керамика и даже монокристалл [1].

В ходе нашего исследования проводился модельный эксперимент для оценки способности композиционных полимерных материалов к деградации. Эксперимент соответствовал реальным условиям деградации в окружающей среде с воздействием на материал ограниченного количества факторов, таких как температура и влажность. Для оценки биологического разрушения полимерных композиционных материалов был проведен почвенный тест, соответствующий естественным условиям, с обеспечением оптимальных условий, таких как температура и влажность.

По истечении периода активации почвенной микрофлоры полимерные образцы изымались из контейнера с почвой, и производился смыв с поверхности полимеров для получения накопительной культуры микроорганизмов.

Анализ микробного сообщества почвенных организмов проводился по результатам посева на питательные среды с подсчетом числа колониеобразующих единиц.

Дальнейшие исследования были связаны с идентификацией доминирующих групп микроорганизмов в почвенных образцах. Микроскопические исследования осуществлялись посредством световой и бинокулярной микроскопии. На этом этапе изучались морфологические и культуральные свойства микроорганизмов.

Развитие микроорганизмов почвенных сред оценивалось по ферментативной (дегидрогеназной и протеазной) активности, поскольку данные показатели отражают изменения в микробном сообществе в результате воздействия внешних факторов. Являясь наиболее изученными и часто применяющимися в экологических исследованиях, оценивалась активность дегидрогеназы и протеазы.

Активность дегидрогеназы существует только в живых клетках и зависит от биомассы и активности микроорганизмов в почве, поэтому может служить мерой микробной биомассы. Количественное определение дегидрогеназной активности микроорганизмов проводили по методике, основанной на их контакте с субстратом и акцептором водорода. Акцептором водорода являлся краситель метиленовый синий (длина волны 665 нм), а активность дегидрогеназы определяли по скорости изменения концентрации метиленового синего в ферментативной реакции. О степени дегидрогеназной активности микроорганизмов в предлагаемом способе судили по убыли концентрации метиленового синего в ячейке, которую регистрировали оптическим способом [2].

В качестве основных групп микроорганизмов, которые доминируют в образцах почвы в результате биодеградации полимерных материалов, выявлены микроорганизмы: *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus idosus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, микроорганизмы рода *Pseudomonas*.

Показано, что культивирование микроорганизмов и бактериальной суспензии на поверхности полимерных образцов вызывает их биодеградацию в разной степени. Это обусловлено как различной активностью разных групп микроорганизмов, так и химическим составом полимерных композиций.

Биоразлагаемый наноструктурированный композиционный материал на основе 2-гидроксипропионовой (молочной) кислоты благодаря своей предельно низкой токсичности и способности к биоразложению позволит решить актуальные отечественные проблемы полимеров медицинского назначения, а также может использоваться в биомедицинских, фармацевтических, экологических и промышленных областях.

Благодарность: к.т.н. Балаковского инженерно-технического института Щербиной Н.А. за предоставление материалов для выполнения исследования.

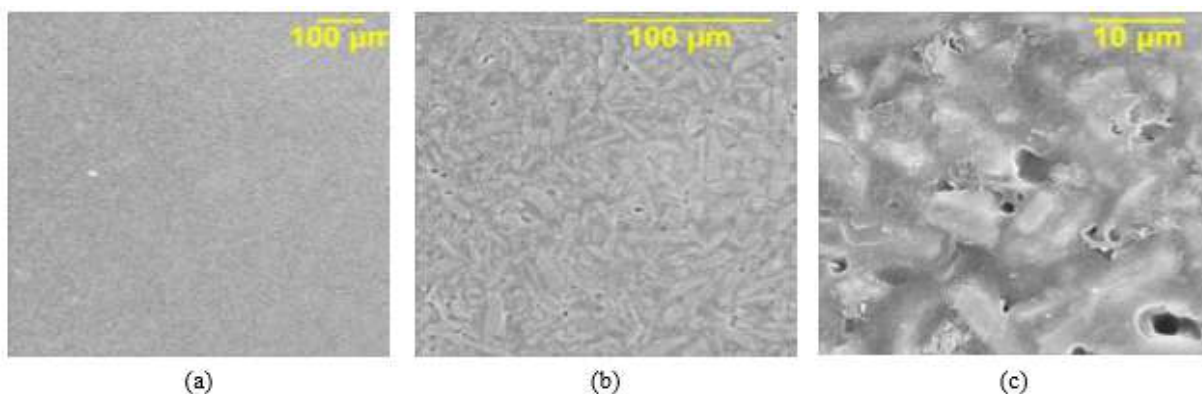


Рис. 1 – Топографическое исследование поверхности наноструктурированного композиционного материала: (a) – исходный образец; (b), (c) – наноструктурированный материал

Литература

1. Щербина Н.А. Разработка состава биоразлагаемого полимерного композиционного материала / Н.А. Щербина, Е.В. Бычкова и др. // Сборник трудов IV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и пути развития энергетики, техники и технологий», Балаково. 2018. С. 243-245.
2. Пат. 2476598 Российская Федерация, МПК6 C1201/32C12M9/02. Способ количественного определения дегидрогеназной активности микро-организмов / Чухчин Д. Г., Тупин П. А.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северный (Арктический) федеральный университет» (С(А)ФУ), –№ 2011116872/10; заявл. 27.04.2011, опубл. 10.11.2012.

УДК 579.61

Изучение фотодинамической активности фталосенса на модели нематод *C. elegans*

И.С. Бендик¹, Е.И. Марусич¹, Н.В. Малимоненко^{1,2}, Б.Я. Коган^{1,2}, С.В. Леонов^{1,3}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»

³Институт Биофизики клетки РАН

В медицине широко используется метод фотодинамической терапии (ФДТ) в лечении широкого спектра как предопухолевых, так и онкологических заболеваний [1]. Среди активно действующих соединений ФДТ наиболее широко используется группа фотосенсибилизаторов на основе фталоцианинового кольца [2, 3]. Фотосенсибилизатор фталосенс – новейший и активно исследующийся фотосенсибилизатор на основе безметалльного фталоцианина [4, 5].

В данной работе было впервые проведено исследование биологической активности фталосенса под воздействием инфракрасного излучения на модели синхронизированных нематод *Caenorhabditis elegans* (штамм Bristol N2 дикого типа) стадии развития L4. В качестве среды для кормления выступали бактерии *Escherichia coli* (штамм OP50). Плотность бактерий контролировалась при помощи спектрофотометра CLARIOstar Plus (Германия). Нематоды инкубировались в жидкой среде в 96-луночных планшетах (TPP, Швейцария) при 20°C в климатическом боксе Binderbox (Германия). До начала воздействия фотодинамической терапии нематоды на стадии L4 были выдержаны в соответствующих растворах фталосенса в течение 48 часов при температуре 20°C. Была изучена фотодинамическая активность фталосенса при облучении нематод в течение 5 и 10 минут. Удельная мощность излучения 20 мВт/см². Тестировали фталосенс в концентрациях: 6 µM, 12 µM (Рис. 1) и 24 µM (Рис. 2). Выживаемость нематод после проведения ФДТ наблюдали под микроскопом AXIO Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Морфологические изменения фиксировали на автоматизированном микроскопе Image Xpress Micro XL (Molecular Devices, США).

При инкубировании нематод в течение 160 часов после их облучения при максимальной тестируемой концентрации фталосенса 24 µM не наблюдалось видимой разницы в выживаемости нематод как при 5-, так и при 10-минутной дозе облучения. После 40 часов инкубации около 15% облучённых нематод умерли, по сравнению со 100% выжившей популяцией контрольных особей,

которые не имели контакта с фталосенсом. К концу эксперимента остались в живых всего 6% тестируемых нематод при обеих дозах облучения по сравнению с 56% контрольных особей. При снижении концентрации фталосенса до 12 μM процент выживших нематод на конец мониторинга увеличился до 12% и 11% при 5- и 10-минутном облучении, соответственно. При этом наблюдалось отличие в динамике умирания нематод первые 40 часов после облучения в зависимости от дозы. Так, если при 5-минутном облучении умерло только 8%, то при 10-минутном уже 19 % нематод. При 6 μM концентрации фталосенса наблюдался ещё больший разрыв в динамике умирания нематод при разной дозе облучения. В конце эксперимента осталось 33% нематод при 5-минутном облучении, и только 19% при 10-минутном облучении по сравнению с 56% живых контрольных особей за тот же период времени инкубации.

Чтобы ответить на вопрос о влиянии концентрации фталосенса на динамику устойчивости нематод к ФДТ, методом линейной аппроксимации был проведен расчёт скорости умирания нематод в интервале от 40 до 160 часов инкубации, выраженной в процентах умерших червей в час. При этом количество червей в этих расчетных точках усреднялось для 5- и 10-минутных доз облучения. Было установлено, что при концентрациях фталосенса 6, 12 и 24 μM скорость умирания червей составляет 0.46%/ч, 0.63%/ч и 0.66%/ч, соответственно.

Мы также проанализировали влияние времени облучения на выживаемость нематод при разных концентрациях фталосенса. Наиболее значимыми оказались результаты количества выживших червей через 160 часов инкубации (Рис. 3). Наши результаты показали, что независимо от исходной концентрации фталосенса большая (10-минутная) доза облучения приводит к большему умиранию нематод по сравнению с 5-минутной. Это лучше всего видно при сравнении выживаемости при концентрации 6 μM : после 10-минутной дозы облучения умерло более чем на 13% нематод больше по сравнению с 5-минутной. Такая же, но менее заметная динамика наблюдалась и при остальных концентрациях фталосенса.

Таким образом, на модели *C. elegans* была доказана биологическая активность фталосенса. Была продемонстрирована целесообразность использования нематод при изучении новых фотосенсибилизаторов, применяемых в ФДТ. Наше исследование открывает перспективы дальнейшего изучения механизма действия фталосенса и его применения в будущем при лечении различных типов онкологических заболеваний. Работа была выполнена в Лаборатории разработки инновационных лекарственных средств и агробиотехнологий, МФТИ.

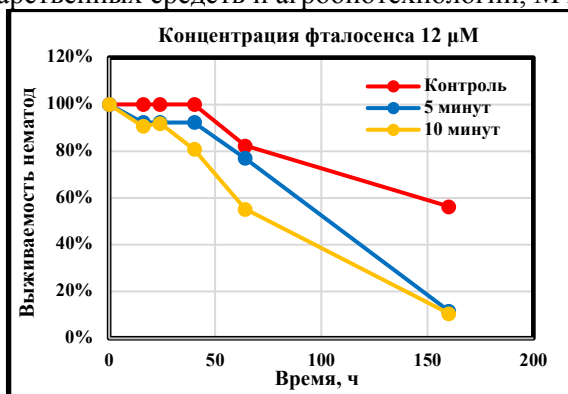


Рис. 1

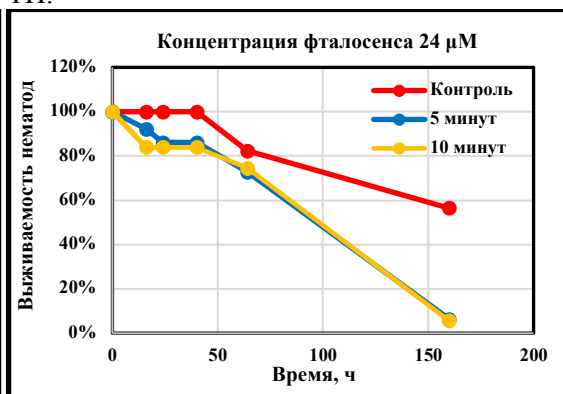


Рис. 2

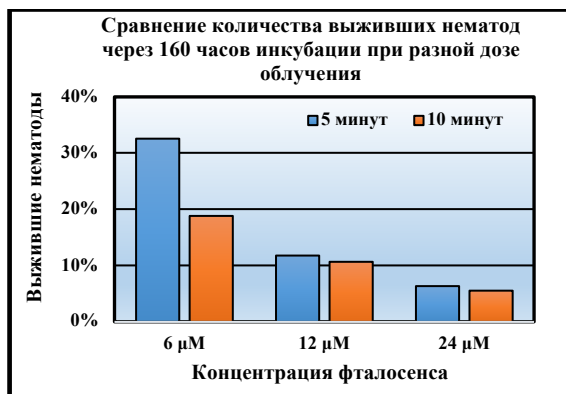


Рис. 3

Литература

1. Kwiatkowski S., Knap B., Przysupski D., Saczko J., Kędzierska E., Knap-Czop K., Kotlińska J., Michel O., Kottowski K., Kulbacka J. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations // J. Biomed Pharmacother. 2018. V. 106 P. 1098-1107.
2. De Annunzio S., Costa N., Mezzina R., Graminha M., Fontana C. Chlorin, Phthalocyanine, and Porphyrin Types Derivatives in Phototreatment of Cutaneous Manifestations: A Review // Int J Mol Sci. 2019. V. 8 P. 3861.
3. Ruiz-González R., Setaro F., Gullías O., Agut M., Hahn U., Torres T., Nonell S. Cationic phthalocyanine dendrimers as potential antimicrobial photosensitisers // Org Biomol Chem. 2017. V. 31 P. 9008-9017.
4. Brilkina A., Dubasova L., Sergeeva E., Pospelov A., Shilyagina N., Shakhova N., Balalaeva I. Photobiological properties of phthalocyanine photosensitizers Photosens, Holosens and Phthalosens: A comparative in vitro analysis // J Photochem Photobiol B. 2019. V. 191 P. 128-134.
5. Brilkina A., Peskova N., Dudenkova V., Gorokhova A., Sokolova E., Balalaeva I. Monitoring of hydrogen peroxide production under photodynamic treatment using protein sensor HyPer // J Photochem Photobiol B. 2018. V. 178 P. 296-301.

УДК 615.46

Воздействие магнитной гипертермии опосредованной наночастицами оксида железа на жизнеспособность клеток рака молочной железы MDA-MB-231

О.Я. Брикунова^{1,2}, Т.А. Боброва³, С.А. Ескин¹, А.Г. Першина^{1,2}

¹Сибирский государственный медицинский университет

²Томский политехнический университет

³Национальный исследовательский Томский государственный университет

Исследована способность магнитных наночастиц оксида железа, модифицированных силиконовой оболочкой и ПЭГ, вызывать гибель опухолевых клеток линии MDA-MB-231 посредством гипертермии при наложении переменного магнитного поля.

Для исследования использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231. К клеткам добавляли наночастицы оксида железа до конечной концентрации 0,5 и 5 мг/мл и далее инкубировали без или при наложении переменного магнитного поля (AFM) с использованием генератора TOR ULTRA HT (NanoSystems, Россия). Время экспозиции AFM (напряженность 27 мТл, частота 230 кГц) составляло 2 и 24 часа. Для оценки жизнеспособности клеток использовали метод окрашивания с йодистым пропидием (PI) и FITC-меченым AnnexinV (Biolegend, США), анализ проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter).

Анализ данных проточной цитофлуориметрии показал, что после 60-минутного воздействия AFM на клетки в присутствии наночастиц в концентрации 5 мг/мл, наблюдали увеличение числа клеток с цитофлуориметрическими признаками апоптоза. Было отмечено, что уже через два часа после применения переменного магнитного поля, в образцах клеток с добавлением магнитных наночастиц, доля PI⁺AnnexinV⁺ клеток возрастала до 40,7±26,7%, а через 24 часа увеличивалась до 70,9±23,2 % (Рис. 1). В образцах клеток, инкубированных с наночастицами без наложения AFM, доля PI⁺AnnexinV⁺ клеток составляла 2,8±0,4 и 9,7±1,7% через 2 и 24 часа соответственно.

Таким образом, наночастицы оксида железа, модифицированные силиконовой оболочкой и ПЭГ, способны вызывать гибель опухолевых клеток линии MDA-MB-231 за счет эффекта магнитной гипертермии и обладают потенциальным терапевтическим эффектом для лечения аденокарциномы молочной железы человека.

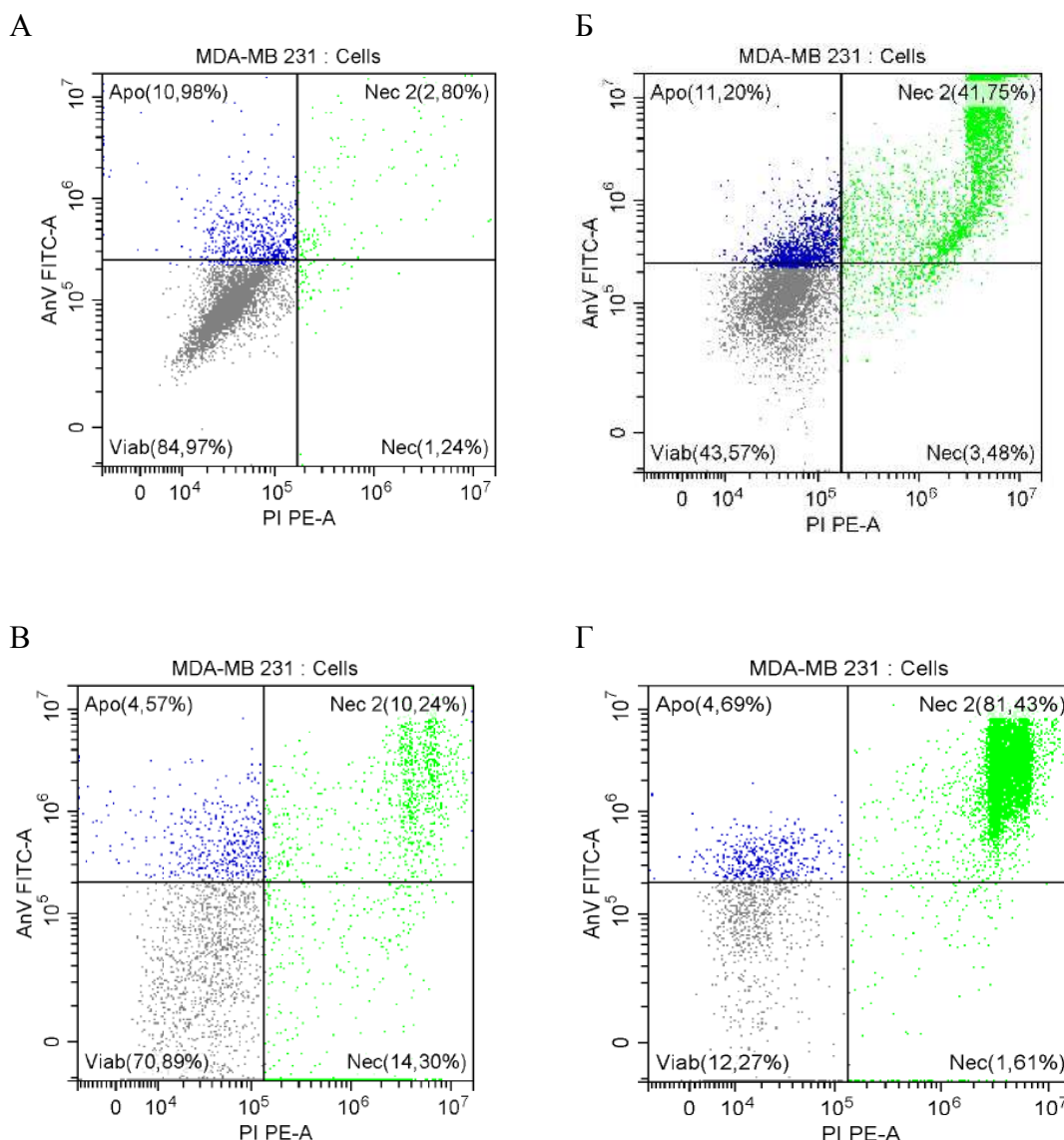


Рис. 1. Репрезентативные точечные диаграммы, полученные в результате анализа методом проточной цитофлуориметрии клеток линии MDA-MB-231, проинкубированных с наночастицами оксида железа в концентрации 5 мг/мл и окрашенных с использованием PI и FITC-меченого AnnexinV через 2 часа после инкубации (А) без и (Б) при экспозиции AFM (27 мТл, 230 кГц) в течение 60 минут, через 24 часа после инкубации (В) без экспозиции и (Г) при экспозиции AFM (27 мТл, 230 кГц) в течение 60 минут.

Литература

1. Kossatz S, Grandke J, Couleaud P, et al. Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery // Breast Cancer Res. 2015.
2. Giustini AJ, Petryk AA, Cassim SM, Tate JA, Baker I, Hoopes PJ. Magnetic nanoparticle hyperthermia in cancer treatment // Nano Life. 2010.

УДК 504.064:577.114.4:628.349.081

Иммобилизация урана в полисахаридном матриксе микробных биопленок при in situ биоремедиации водоносных горизонтов вблизи шламохранилищ

Попова Н.М.¹, Сафонов А.В.¹, Бабич Т.Л.²

¹Лаборатория химии технеция ИФХЭ РАН

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

Изменение сорбционных свойств пород при их загрязнении ураном происходит за счёт развития микробных биопленок, образование которых можно контролировать *in situ* инъекцией органических добавок, создавая систему, подобную микробному биофильтру. На примере полисахарида микробного матрикса штамма *Pseudomonas veronii* A-6-5 изучен механизм иммобилизации урана в полисахаридах микробного матрикса.

The presence of microbial biofilms leads to a change in the sorption properties of the rocks. The microbial polysaccharide of the bacterium *Pseudomonas veronii* strain A-6-5 was isolated and its molecular structure was established. Besides, was studied the nature of polysaccharide interaction with the uranyl ion.

Разрушение защитных барьеров шламохранилищ предприятий переработки урана приводит к инфильтрации макрокомпонентов отходов (нитрат и сульфат-ионов) и урана в виде растворимого уранил-иона и урана в водоносные горизонты и их неконтролируемой миграции с током подземных вод. Попадание биогенных элементов приводит к интенсификации микробных процессов, которые необходимо учитывать при построении многофакторных моделей миграции загрязнений. Управление микробными процессами в загрязнённых подземных водах может быть использовано для их очистки и иммобилизации загрязнителей *in situ*.

В работе изучено влияние микробных биопленок на сорбционные параметры суглинистых пород водоносного горизонта в районе хранилища радиоактивных отходов Сибирского химического комбината АО "СХК". В модельных экспериментах после однократного глюкозно-ацетатного стимулирования установлено, что появление биопленки ведет к накоплению органического вещества на породе и образованию новых органических функциональных центров, в первую очередь карбоксильных, карбонильных и гидроксильных групп полисахаридов, приводящих к увеличению сорбционной емкости пород для уранил-иона.

Для изучения механизмов иммобилизации урана был выделен полисахарид *Pseudomonas veronii* A-6-5, входящего в состав микробных биопленок, и определена его структура (рис. 1). Методом ИК-спектроскопии в нейтральных значениях pH показана доминирующая роль карбонильной группы полисахарида в хелатировании иона уранила (рис. 2).

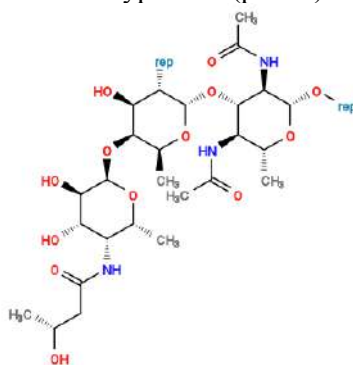


Рис. 1. Строение полисахарида *Pseudomonas veronii*

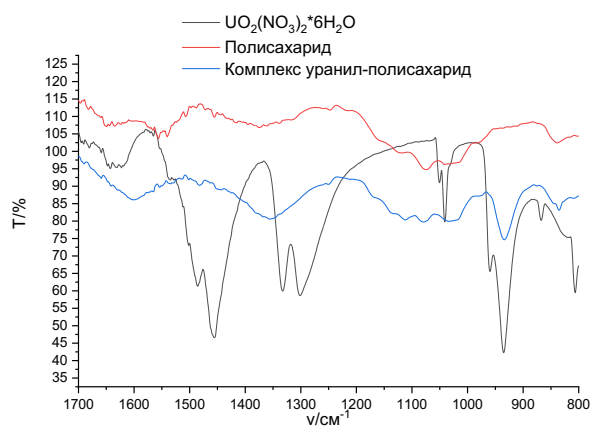


Рис. 2. FTIR спектры НПВО полисахарида, уранила и образованного комплекса

Инновационный метод контроля серосодержащих соединений в пищевых продуктах*Л.Э. Руппель¹, Ю. Д. Афанасьев¹*¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Разработан метод определения количественного содержания серосодержащих соединений (иначе называемые консервантами E220-E228): диоксида серы, бисульфита калия, гидросульфита кальция, гидросульфита натрия, пиросульфита калия, пиросульфита натрия, сульфита калия, сульфита кальция, сульфита натрия. Данные консерванты вызывают аллергическую реакцию у части людей [1].

Для определения требуется произвести дериватизацию, преобразовав вышеперечисленные соединения в гидроксиметилсульфонат $\text{CH}_3\text{O}_4\text{S}^-$, смешав гомогенат исследуемого вещества с формальдегидом [2]. Благодаря дериватизации, не требуется отдельных проверок концентраций каждого отдельного соединения, более того, согласно ТР ТС 029, содержание вышеупомянутых консервантов измеряется в пересчете на диоксид серы.

Далее к смеси добавляется дихлорметан CH_2Cl_2 для обезжиривания образца и происходит экстракция гидроксиметилсульфоната с помощью лабораторного шейкера, ультразвукового гомогенизатора, центрифугирования, дальнейшего отбора экстракта, его нагрева на термощейкере и, после добавления ацетонитрила, повторном центрифугировании для осаждения нежелательных примесей. Для гомогенизации порошков дожидаются его растворения, в случае измельченных макарон – их размокания, в случае прочных матриц, не гомогенизируемых обычным перемешиванием (например, мясо) можно воспользоваться шейкером и металлическими шариками, дробящими вещество, которое требуется гомогенизировать.

С помощью такой процедуры связанные сульфиты экстрагируются в раствор, на выходе остаётся раствор, содержащий исследуемый гидроксиметилсульфонат.

С помощью масс-спектрометра был разработан метод, позволяющий определить содержание исследуемого вещества. Были выбраны 2 МС/МС перехода, один (более интенсивный) для интегрирования с дальнейшим определением концентрации исходного вещества, второй (менее интенсивный) для контроля идентификации соединения. Также, были оптимизированы константы масс-спектрометра, отвечающие за деление молекул вещества и перенос ионов внутри ионной оптики. Оптимизация ведет к усилению сигнала на выходе, увеличению точности измерений.

Используемые для хроматографии фазы: фаза А – 200 мМ раствор формиата аммония с 0.2% муравьиной кислотой в воде, фаза В – ацетонитрил с 1.0% муравьиной кислотой. Данные концентрации были выбраны путем вариации концентраций всех составляющих. Данные фазы вместе с используемым градиентом (рис. 1) позволяют добиться качественной формы пика, времени удерживания и высоты пика.

Используемая колонка для хроматографирования – ВЕН HILIC (этилен-мостиковая гибридная жидкостная хроматография с гидрофильным взаимодействием), содержащая ВЕН частицы, позволяющие удерживать и разделять полярные частицы. Были оптимизированы константы, влияющие на ионизацию исследуемого вещества, происходящую после его прохождения через колонку. Оптимизация также позволяет повысить пик и улучшить его форму.

Также, был исследован вклад матричного эффекта и определена степень экстракции для исследуемых веществ. Это требуется для того, чтобы убедиться в высокой степени экстракции и отсутствия матричного эффекта, без которых определить количественно содержания гидроксиметилсульфоната нельзя наверняка. Для этого хроматографировались дополнительные гомогенаты, в которые вносился раствор, содержащий ионы SO_3^{2-} , исследовались хроматограммы.

В итоге, метод позволяет достичь требуемой пороговой чувствительности измерений в единицы миллиграмм на килограмм вещества.

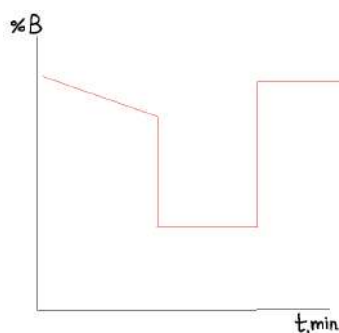


Рис. 1: Типичное изображение используемого в данном эксперименте градиента фаз

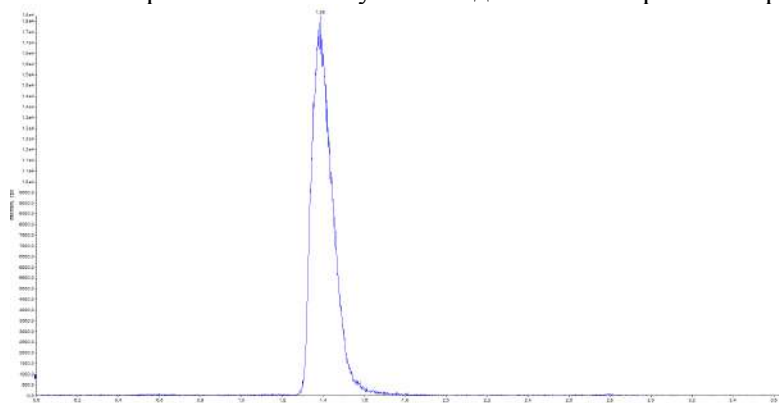


Рис. 2: Пример хроматограммы для вещества, содержащего сульфиты

Литература

1. Vally H., Misso N.L. Adverse reactions to the sulphite additives // Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench. 2012;5(1):16–23.
2. Stephanie T.O., Geraldine L.R. Uptake of SO₂ to Aqueous Formaldehyde Surfaces // Journal of the American Chemical Society 2012 134 (24), 9967-9977 DOI: 10.1021/ja211632r.

УДК 502.51

Исследование антиоксидантной активности экстрактов плодов рябины обыкновенной методом биотестирования

Г.Р. Багаутдинова, Ю.В. Щербакова, Ф.Ю. Ахмадуллина, Ю.В. Семенова, К.А. Насрулина

Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

Особое значение в современных неблагоприятных экологических условиях отводится питанию, которое должно обеспечить ослабление негативного действия вредных экофакторов на организм человека, способствовать повышению его защитно-приспособительных возможностей, и, как следствие снизить риск развития различных патологий. При этом, необходимо учитывать, что рацион современного человека должен быть богат биологически активными компонентами, способными проявлять антиоксидантные свойства.

В качестве источников антиоксидантов в последнее время ученые все чаще рассматривают экстракты растений, антиоксидантные свойства которых напрямую зависят от содержания в них полифенолов. Важно отметить, что из всего многообразия растительного сырья только 10% исследуемых растительных источников достаточно обогащены полифенолами и могут быть использованы в качестве эффективных натуральных антиоксидантов. Среди них особая роль отводится *Sorbus aucuparia*, антиоксидантная активность которой описывается как сопоставимая, или даже выше многих ценных ягод, таких как арония, черника, водяника.

Чаще всего рябина как источник БАВ применяется в виде экстрактов, которые обладают стабильным фармакологическим эффектом.

В связи с этим целью настоящей работы являлась оценка антиоксидантной активности экстрактов рябины обыкновенной.

Экстракты получали методом Сокслета, который является на сегодняшний день одним из наиболее перспективных методов получения экстрактов из растительного сырья [1].

Антиоксидантную активность определяли методом биотестирования, который отличается высокой чувствительностью, сравнительно низкой стоимостью проведения работ и самое главное дает интегральную оценку исследуемого объекта [2]. В качестве тест-объекта были выбраны инфузории *Paramecium caudatum*, которые отвечают всем необходимым требованиям, предъявляемым к тест-объектам [3].

Стрессором был выбран этиловый спирт (мембранотропное вещество), который является индикатором, повреждающим биомембраны клеток [4]. При этом основным параметром исследования являлось время обездвиживания парameций под воздействием стрессора.

На начальном этапе работы осуществляли подбор оптимального количества экстракта (5%), вносимого в среду культивирования (среда Лозин-Лозинского). Для этого оценивали функцию размножения инфузорий в течение 3 суток. Наилучшие результаты были получены при внесении экстракта в количестве 5 мкл на 6 мл среды культивирования.

Для определения стрессоустойчивости изначально подбирали оптимальную концентрацию стрессора. Было выявлено, что использовать этиловый спирт рационально в концентрации 7%, поскольку, при увеличении его концентрации (10-14%) наблюдалось почти мгновенное обездвиживание парameций, а при уменьшении (5%) значительно увеличилось время их выживаемости, что затрудняло определение точного времени остановки инфузорий. Время обездвиживания *Paramecium caudatum* в 7% этиловом спирте составляло 1-1,5 минуты.

После подбора оптимальной концентрации стрессора проводили эксперимент по определению стрессоустойчивости тест-объекта (рис. 1).

Как видно из полученных результатов, добавление экстракта рябины обыкновенной в среду культивирования инфузорий *Paramecium caudatum* приводит к увеличению их стрессоустойчивости более чем в 2 раза, что вероятно объясняется мощным антиоксидантным комплексом, содержащимся в объекте исследования.

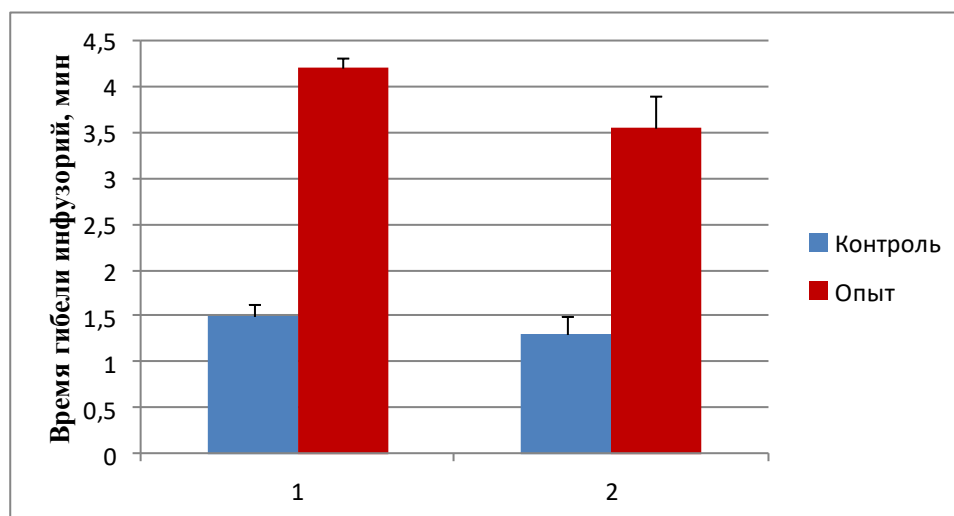


Рис. 1. Результаты исследования на стрессоустойчивость

Литература

1. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов. – Химия растительного сырья. 2004. №3. с. 63-75.
2. Виноходов Д.О., Виноходов В.О., Гинак А.И., Ананченко И.В. Зависимость "концентрация - время" в острых опытах // Инфузории в биотестировании. Тезисы докладов международной заочной научно-практической конференции -СПб, 1998 – с. 73-78
3. Половинкина Е.О. Окислительный стресс и особенности воздействия слабых стрессоров физической природы на перекисный гомеостаз растительной клетки / Половинкина Е.О., Синецына Ю.В. // Уч. пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2010. – с. 62
4. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Владимиров Ю.А. // Вестн. Рос. акад. мед. наук. – 1998. - №7. – с. 43-51.

Исследование взаимодействия эмодина с модельными липидными мембранами**П. А. Кононова^{1,2}, О. Ю. Селютина^{1,3}, Н. Э. Поляков^{1,3}**¹Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН²Новосибирский государственный университет³Институт химии твёрдого тела и механохимии СО РАН

Эмодин (6-метил-1,3,8-тригидроксиантрахинон) – хелатор растительного происхождения с широким спектром биологической активности [1]. Структурная формула эмодина представлена на рис.1. Из-за его гидрофобности, взаимодействие эмодина с клеточными мембранами может играть важную роль в его биологической активности. Изучалось взаимодействие эмодина с модельными мембранами РОРС (1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин) методами оптической и ЯМР-спектроскопии и методом молекулярной динамики [2]. В настоящей работе мы исследовали влияние липидного состава, в частности влияние линолевой кислоты, на взаимодействие эмодина с липидным бислоем.

Методом оптической спектроскопии было показано, что в присутствии линолевой кислоты в липидном бислое изменяется рКа эмодина. Значение рКа эмодина в липосомах РОРС в отсутствие линолевой кислоты составляло $7,9 \pm 0,2$, в присутствии линолевой кислоты – $9,2 \pm 0,2$. Методом ЯМР спектроскопии обнаружено, что при изменении рН происходят изменения хим. сдвигов протонов эмодина. При этом в присутствии линолевой кислоты в липидном бислое происходят более сильные изменения. Изменения химических сдвигов могут быть вызваны изменениями химической среды из-за депротонирования. Анализ ЯМР-спектров и моделирование методом молекулярной динамики показывают, что наблюдаемые изменения могут быть связаны с взаимодействием эмодина и линолевой кислоты внутри бислоя.

В экспериментах с модельными мембранами РОРС обнаружено, что эмодин взаимодействует с линолевой кислотой внутри бислоя. Было продемонстрировано, что в присутствии линолевой кислоты значение рКа эмодина значительно увеличивается.

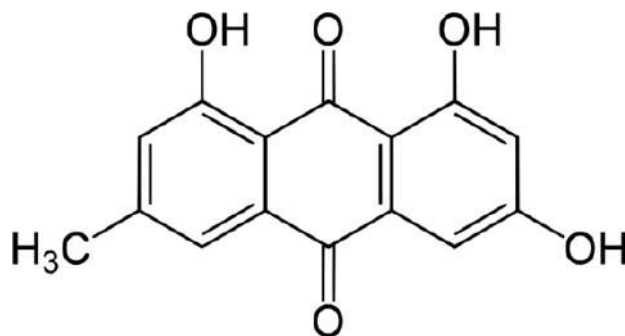


Рис. 1. Структурная формула эмодина.

Литература

1. Dong X., Fu J., Yin X., Cao S., X. Li, Lin L., Ni J., Emodin: A Review of its Pharmacology. Toxicity and Pharmacokinetics. // *Phytother. Res.* 2016, V.30, P.1207–1218.
2. Selyutina O.Yu., Kononova P.A., Polyakov N.E., Experimental and Theoretical Study of Emodin Interaction with Phospholipid Bilayer and Linoleic Acid. // *Applied Magnetic Resonance*, 2020, 1.8

Исследование донорно-акцепторных свойств тиосемикарбазона Dr44mT и его комплексов с ионами Zn в фотохимических реакциях методами ЯМР и ХПЯ**А.С. Архипова^{1,2}, В.А. Тимошников¹, О.Ю. Селютина^{1,3}, Н.Э. Поляков^{1,3}**

Еще в 1950-х годах была обнаружена противораковая активность тиосемикарбазонов (ТСК). Основной механизм действия ТСК, описанный в литературе, заключается в ингибировании рибонуклеотид редуктазы. Помимо этого, ТСК способны образовывать хелатные комплексы с ионами металлов, в частности, ионами железа меди, цинка - жизненно важными элементами для нормального функционирования клеток, тканей и организма в целом. С этой особенностью связан другой механизм противоракового действия, основанный на неконтролируемой генерации активных кислородных радикалов. Кроме того, недавние исследования показали, что некоторые ТСК демонстрируют усиление противоопухолевой активности в фотоиндуцированных реакциях, однако детальный механизм действия описан не был [1,2]. В качестве исследуемого ТСК был выбран Dp44mT (рис. 1), проявляющий противораковую активность [3]. Исходя из структуры данного ТСК можно предположить, что данный хелатор способен проявлять как донорные, так и акцепторные свойства в фотохимических реакциях.

Целью данной работы являлось исследование фотохимической активности ТСК Dp44mT (Рис. 1), а также его комплексов с ионами цинка в реакциях с участием доноров и акцепторов электрона. В качестве доноров были выбраны N-ацетил замещенная аминокислота тирозин и нуклеиновое основание гуанозин монофосфат, а в качестве акцептора выступил хинон AQDS. Работы проводились в смеси растворов вода-ДМСО. На основании данных полученных методами ЯМР и химической поляризации ядер (ХПЯ) был сделан вывод, что Dp44mT, а также его комплексы с ионами цинка, являются фотохимически активными при облучении светом с длиной волны 308 нм. Показано, что Dp44mT способен вступать в реакцию переноса электрона с хиноном AQDS с образованием радикальных интермедиатов. В присутствии ионов Zn скорость фотодеградации Dp44mT в фотохимической реакции с хиноном AQDS значительно падает. В присутствии доноров электрона N-ацетил тирозина и гуанозин монофосфата Dp44mT не проявляет акцепторные свойства, радикальных интермедиатов не обнаружено.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-33-70019.

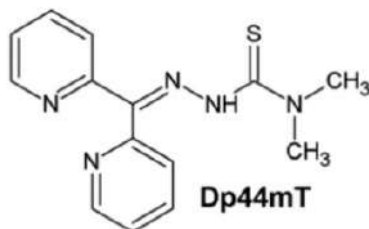


Рис. 1. Структура тиосемикарбазона Dp44mT.

Литература

1. Mrozek-Wilczkiewicz A., Serda M., Musiol R., Malecki G., Szurko A., Muchowicz A., Golab J., Ratuszna A., Polanski J. Iron chelators in photodynamic therapy revisited: Synergistic effect by novel highly active thiosemicarbazones // ACS Med. Chem. Lett. 2014. V.5. P: 336-339.
2. Mrozek-Wilczkiewicz A., Malarz K., Rams-Baron M., Serda M., Bauer D., Montforts F., Ratuszna A., Burley T., Polanski J., Musiol R. Iron chelators and exogenic photosensitizers. Synergy through oxidative stress gene expression // J. Cancer. 2017. V. 8. P: 1979-1987.
3. Gutierrez E.M., Seebacher N.A., Arzuman L., Lovacevic Z., Lane D.J.R., Richardson V., Merlot A.M., Lok H., Kalinowski D.S., Sahni S., Jansson P.J., Richardson D.R. Lysosomal membrane stability plays a major role in cytotoxic activity of the anti-proliferative agent, di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT) // Biochim Biophys. acta. 2016. V. 1863. P: 1665-1681.

УДК 57.04

Исследование степени биодеградации полимерного покрытия барьерного типа, модифицированного биоцидами

В.А. Орехова, А.А. Мельникова, Л. Н. Комарова

В настоящее время актуальным вопросом остается борьба с биообрастанием, коррозией, старением и биоповреждением материалов и конструкций в морской и пресной воде, что затрудняет эксплуатацию различных конструкций, вплоть до полной её невозможности. Обрастание тесно связано с коррозией материалов, зачастую многократно увеличивая её скорость и степень повреждения судов и портовых сооружений. Борьба с коррозией и биообрастанием должна предусматривать не тотальное уничтожение организмов сообществ обрастания, а комплекс операций, обеспечивающих минимальное проявление негативного воздействия.

Одним из наиболее эффективных способов защиты металлических и бетонных конструкций от агрессивных сред, атмосферного воздействия, обрастания и коррозии является использование защитных покрытий барьерного типа.

Целью работы являлась оценка степени биодegradации полимерного покрытия барьерного типа на основе эпоксидной смолы, модифицированного биоцидами.

На основе эпоксидных смол изготавливается огромное число материалов для различных областей применения. Они используются в радиоэлектронной, электротехнической промышленности, судо-, авиа- и машиностроении, в том числе они используются как пленкообразующие лакокрасочные материалы, как компоненты пропиточных, заливочных компаундов, герметиков, клеев и прочее. Широкий выбор пленкообразователей позволяет создавать средства с самыми разными свойствами. Данные составы применяются для противокоррозионной защиты изделий из дерева, бетона, пластмасс, металлических конструкций и других. Для этих целей используют около 50% общего мирового производства эпоксидных смол [1].

В качестве исследуемого полимерного покрытия нами использовалась двухкомпонентная эпоксидная смола прозрачного цвета, состоящая из самой эпоксидной смолы (компонент А) и отвердителя (компонент В).

Для оценки степени биодegradации материалов водными организмами используется вода: морская, пресная, проточных водоемов, закрытых водоемов, естественных и искусственных водоемов, в т.ч. вода из аквариумов. Для оценки степени биодegradации исследуемый материал погружается в воду и выдерживается в течение 30 суток, после чего, исследуемые образцы осматриваются на наличие, выросшей на них биопленки [2]. После чего производится идентификация и подсчет различных групп организмов. По количеству и разнообразию организмов определяется степень биодegradации исследуемого материала.

Первоначально, нами была поставлена задача, определить влияние срока выдерживания покрытия на воздухе на степень последующего биообрастания. Но, как известно, суда могут находиться на ремонте меньшее количество времени, поэтому важно было понять, влияет ли степень затвердевания покрытия на степень последующего биообрастания. Исследуемые нами образцы полимерного покрытия барьерного типа выдерживались на воздухе в течение 1, 5 и 7 суток для затвердевания, затем пластины помещали в аквариумы, и через определенные промежутки времени проводилась оценка степени обрастания поверхности.

Для придания стойкости покрытию к биообрастанию используют различные добавки, которые губительно действуют на живые объекты. В наших исследованиях мы использовали 80% бензалконий хлорид в концентрациях 0,5, 1, 2 и 5%. Мы выяснили, что применение бензалкония хлорида приводит к снижению обрастания образцов сине-зелеными и зелеными водорослями, а также снижает количество инфузорий, в связи с уменьшением их кормовой базы.

По результатам теста на биообрастание мы выяснили, что в основном в водной среде на данном типе покрытия поселяются сине-зеленые (хлорококк *Chlorococcum*, протококк *Protococcum*, ксенококк *Csenococcum*, микроцистис *Microcystis*) и зеленые водоросли (хлорелла *Chlorella*), а также различные инфузории. Среди почвенных микроорганизмов на поверхности полимерного покрытия барьерного типа селятся в основном *Rhizobium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus idosus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*.

Оценка эффективности 80% бензалкония хлорида как биоцидной добавки показала, что препарат в концентрациях 0,5, 1, 2 и 5% влияет на степень биообрастания, степень устойчивости к разложению плесневыми грибами, а также на степень биодеструкции почвенными микроорганизмами. Наиболее оптимальными концентрациями бензалкония хлорида являются – 2% и 5%.

Есть мне о том, что если полимерное покрытие барьерного типа некоторое время находилось в водной среде, и на его поверхности образовалась биопленка из водных микроорганизмов, ее можно механически удалить, и в дальнейшем данное покрытие будет обрастать гораздо меньше, вследствие того, что под биопленкой создан уже более прочный и устойчивый слой. Считается,

что изначальные слои полимерного покрытия тесно взаимодействуют с водой, и происходит взаимопроникновение, что нарушает структуру полимерного покрытия барьерного типа и снижает его эффективность.

Всего в ходе исследований нами было изготовлено и изучено 1 350 образцов. Мы выяснили, что полимерное покрытие барьерного типа является биodeградебельным материалом. Выявлено, что снятие биопленки с образцов не влияет на конечный результат биообрастания. Образцы полимерного покрытия барьерного типа, затвердевающие под водой, более сильно подвержены биообрастанию водными микроорганизмами, поэтому красить суда и различные конструкции, которые должны находиться в воде нужно на воздухе.

Литература

1. Карпов В.А. Биокоррозия в морской среде и основы применения защитных покрытий: автореф. дисс. ... докт. хим. наук: 05.17.03 / Карпов Валерий Анатольевич. – М., 2012. – 48 с.
2. Ильин И.Н. Методы изучения обрастания в океане / И.Н. Ильин // Экологические аспекты защиты техники и материалов. Теория и практика натурных испытаний Ч. 2. – М.: ИПЭЭ РАН, 2000. – С. 32-36.

УДК 57.088.53

Исследование формирования липид-детергентных частиц в смесях трифторэтанол-вода

В.В. Мотов^{1,2}, Э.Ф. Кот^{1,2}, С.А. Гончарук², А.С. Арсеньев^{1,2}, К.С. Минеев^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

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

Мембранные белки являются важным объектом структурных исследований в молекулярной биологии. Чтобы получить *in vitro* структуру мембранных белков, близкую к нативной, их помещают в мембраноподобные среды, в качестве которых часто применяются липид-детергентные частицы - изотропные бицеллы [1]. Довольно часто перед переводом в мембраноподобные среды мембранные белки солибилизируют в органических растворителях или их смесях с водой [2]. Однако процесс взаимодействия белка с мембраноподобной средой в ходе приготовления образца, как правило, не контролируется, и выбор оптимального отношения растворителей, при котором должно происходить встраивание белка в мембраноподобную среду, зачастую является эмпирическим.

Целью данной работы являлось исследование поведения бицеллообразующих компонент в смеси трифторэтанол(ТФЭ)/вода, а также взаимодействия с ними альфа-спирального мембранного белка.

В ходе работы с использованием методов ЯМР-спектроскопии и динамического рассеяния света было изучено поведение двух распространенных составов бицелл - DMPC/CHAPS с эффективным соотношением липид/детергент $q^*=1$ и DMPC/DHPC с $q^*=0.5$, а также трансмембранного домена TrkA в присутствии DMPC/CHAPS, при различной полярности растворителя. Установлено, при каких соотношениях растворителей образуются липидные и липид-детергентные агрегаты, а также при какой доле ТФЭ трансмембранный домен TrkA встраивается в липидные частицы. Полученные результаты закладывают основу для разработки методик солиubilизации альфа-спиральных мембранных белков в липидные бицеллы из смесей ТФЭ/вода.

Работа поддержана Грантом РФФИ №19-74-30014.

Литература

1. D. E. Warschawski, A. A. Arnold, M. Beaugrand, A. Gravel, É. Chartrand, and I. Marcotte, 'Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins', *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1808, no. 8, pp. 1957–1974, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.03.016.
2. K. S. Mineev and K. D. Nadezhdin, 'Membrane mimetics for solution NMR studies of membrane proteins', *Nanotechnol. Rev.*, vol. 6, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1515/ntrev-2016-0074.

Капсулированная форма доцетаксела для адресной доставки в раковые клетки**Д.Б. Трушина^{1,2}, Г.А. Посыпанова³, М.А. Ванцян³, Т.В. Букреева^{1,3}**¹Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Направленная доставка терапевтических агентов, повышающая селективность их действия и снижающая побочные эффекты, является одним из приоритетных направлений современных биомедицинских разработок. Эта задача особенно актуальна для противоопухолевых препаратов. Перспективным подходом для ее решения стало инкапсулирование и модификация поверхности капсул векторными молекулами, селективно связывающимися с рецепторами на мембранах раковых клеток.

Капсулы в данной работе получали с помощью послойной адсорбции полиэлектролитов (методика «layer-by-layer») [1] на поверхности субмикронных частиц карбоната кальция (средний диаметр 500 ± 90 нм), полученных по предварительно разработанной методике [2]. После растворения частиц карбоната кальция этилендиаминтетрауксусной кислотой для уменьшения размера полых капсул применяли термоусадку многослойной оболочки [3]. Для этого капсулы, состоящие из трех бислоев поли-L-аргинин/сульфат декстрана, инкубировали 1 ч при температуре 90°C . В результате воздействия температуры средний диаметр капсул снизился до 290 ± 60 нм. Изображение капсул, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа, представлено на рис. 1а.

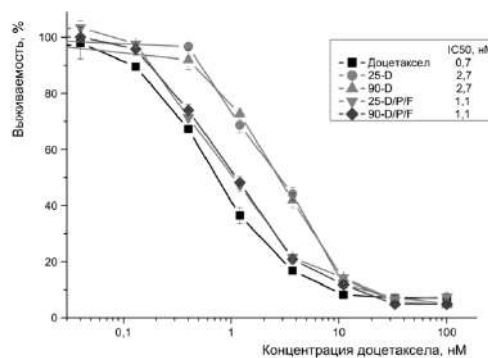
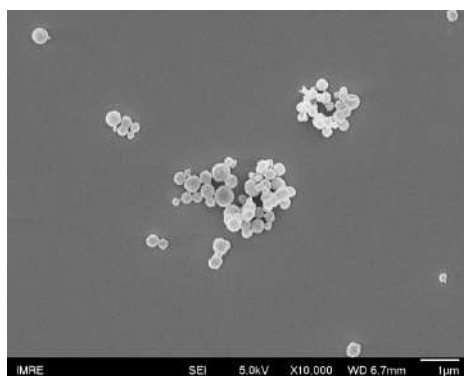
Включение доцетаксела в капсулы производили за счет его адсорбции из раствора в диметилсульфоксиде. Загрузку доцетаксела оптимизировали, варьируя длительность адсорбции и массу добавляемого к капсулам доцетаксела. Эффективность загрузки доцетаксела в капсулы определяли спектрофотометрически на двух характеристических длинах волн (274 и 282 нм) с помощью предварительно построенной калибровочной прямой и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В работе показано, что эффективность загрузки для интактных и предварительно термоусаживаемых капсул практически совпадает. Для обоих типов капсул увеличение длительности инкубирования в растворе доцетаксела от 3 до 17 ч приводит к увеличению загрузки на 14-20%. Увеличение длительности до 23 ч приводит к увеличению загрузки на 25-32%, и становится заметна разница между интактными капсулами и термоусаживаемыми: эффективность загрузки термоусаживаемых капсул ниже, что может быть связано с утолщением оболочки под воздействием температуры.

Для активной адресной доставки носителей лекарственных веществ их поверхность необходимо модифицировать специфическими соединениями, распознающими определенные рецепторы клеток. Одним из таких соединений является фолиевая кислота, обеспечивающая специфическое нацеливание на опухолевые ткани [4], так как ряд раковых клеток сверхэкспрессирует рецепторы фолата. Для обеспечения адресной доставки капсул на их поверхности адсорбировали конъюгат плуроника F127 с фолиевой кислотой, который синтезировали этерификацией полиэфира карбодимидным методом.

Исследование *in vitro* цитостатической активности термоусаживаемых капсул, загруженных доцетакселом и модифицированных конъюгатом плуроника с фолиевой кислотой, показало, что капсулы эффективно подавляют выживаемость опухолевых клеток, гиперэкспрессирующих рецепторы фолиевой кислоты [5]. На рис. 1б представлены кривые выживаемости клеток карциномы шейки матки человека линии HeLa. Приведенные данные демонстрируют, что эффективность полученных адресных капсул с доцетакселом сопоставима со свободным препаратом.

Таким образом, послойная адсорбция полиэлектролитов с последующим термоиндуцированным сжатием оболочек является перспективным способом создания биосовместимых субмикронных капсул с контролируемой загрузкой плохо растворимым в воде лекарственным препаратом. При этом поверхностная модификация таких капсул конъюгатом плуроника с фолиевой кислотой приводит к высокой эффективности разработанных систем с доцетакселом в экспериментах *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт», приказ № 1362 от 25.06.2019 г. с использованием оборудования Ресурсных центров НИЦ «Курчатовский институт».



а) б)
Рис. 1. СЭМ-изображение синтезированных капсул (а) и выживаемость клеток линии HeLa после 72 ч инкубации со свободным доцетакселом, интактными и термоусаживаемыми капсулами, нагруженными доцетакселом (25-D и 90-D, соответственно), интактными и термоусаживаемыми капсулами с доцетакселом и конъюгатом плуроника с фолиевой кислотой на поверхности (25-D/P/F и 90-D/P/F, соответственно)

Литература

1. De Cock L.J., De Koker S., De Geest B.G., Grooten J., Vervaet C., Remon J.P., Sukhorukov G.D., Antipina M.N. Polymeric Multilayer Capsules in Drug Delivery // *Angewandte Chemie International Edition*. 2010. V. 49. I. 39. P. 6954–6973.
2. Trushina D.B., Bukreeva T.V., Antipina M.N. Size-Controlled Synthesis of Vaterite Calcium Carbonate by the Mixing Method: Aiming for Nanosized Particles // *Crystal Growth & Design*. 2016. V. 16. I. 3. P. 1311–1319.
3. Trushina D.B., Bukreeva T.V., Borodina T.N., Belova D.D., Belyakov S., Antipina M.N. Heat-Driven Size Reduction of Biodegradable Polyelectrolyte Multilayer Hollow Capsules Assembled on CaCO₃ Template // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018. V. 170. P. 312–321.
4. Pegah K., Ardestani M.S., Khoobi M., Ostad S.N., Dorkoosh F.A., Javar H.A., Amanlou M. Mesoporous Silica Nanoparticles Functionalized with Folic Acid/Methionine for Active Targeted Delivery of Docetaxel // *OncoTargets and Therapy*. 2016. V. 9. P. 7315–7330.
5. Poltavets Y.I., Zhirnik A.S., Zavarzina V.V., Semochkina Y.P., Shuvatova V.G., Krashenninnikova A.A., Aleshin S.V., Dronov D.O., Vorontsov E.A., Balabanyan V.Y., Posypanova G.A. In vitro anticancer activity of folate-modified docetaxel-loaded PLGA nanoparticles against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells // *Cancer Nanotechnology*. 2019. V.10. I. 1. P. 2.

УДК 577.352.2

Липидная нанотрубка как нанофлюидное устройство для детекции одиночных молекул

К.А. Иванова^{1,2}, П.В. Баширов²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

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

Сенсоры на основе нанопор обладают огромным потенциалом в качестве инструмента для биоаналитического зондирования и секвенирования одиночных молекул, благодаря своим исключительным разрешающим и пропускным способностям, а также низкой себестоимости. Регистрация молекул в нанопоре основана на измерении ионного тока, текущего через нее. Частичная блокировка просвета нанопоры, проходящей через нее молекулой, вызывает характерное изменение амплитуды ионного тока. Анализ формы сигнала - импульса, позволяет определить размер, заряд, дипольный момент молекулы, а также исследовать их динамические преобразования в микросекундном или наносекундном масштабе времени. Чувствительность данного подхода существенным образом зависит от соотношения поперечных размеров молекулы аналита и просвета нанопоры, а также от времени нахождения молекулы внутри нанопоры. Современные исследования и разработки в области развития нанофлюидных детекторов сосредоточены на поиске оптимальных решений задач формирования очень узких нанопор (поперечный размер менее 10 нм) твердотельных мембранах и их дальнейшей модификации с целью увеличения времени прохождения молекулы. В

данной работе мы предлагаем альтернативный метод создания такого наносенсора, где в качестве чувствительного элемента выступает цилиндрическая липидная нанотрубка (НТ). Липидный бислой по своей природе является двумерной жидкостью, это свойство существенно расширяет функциональный режим липидной НТ по сравнению с твердотельными аналогами, поскольку позволяет изменять не только длину НТ в ходе эксперимента, а также добавляя различные факторы к НТ, и ее радиус.

В ходе выполнения данной работы было проведено исследование сенсорных характеристик НТ: шумовых и транспортных. В результате детального параметрического исследования характеристик шума измеряемого ионного тока, текущего через НТ, при различных значениях ионной силы электролита, длины НТ, а также полосы пропускания сигнала было выявлено, что составляющая высокочастотного шума на несколько порядков ниже, чем в нанопористых устройствах на основе твердотельных нанопор. Основными источниками шума тока НТ являются белый и $1/f$ низкочастотный. Значение коэффициента Хуга для $1/f$ шума составило примерно $3 \cdot 10^{-3}$, что на порядок больше, чем в твердотельных нанопорах [1]. Увеличение $1/f$ шума скорее всего объясняется эластичностью НТ, в результате основной вклад в низкочастотный шум вносят флуктуации формы НТ. Однако это не помешало нам разработать подход, позволяющий регистрировать прохождение отдельных молекул через просвет НТ (рис. 1). Для чего был использован специальный молекулярный конструктор – прикрепленный к поверхности мембраны рецептор (ДНК-аптамер) + белок “мишень”. Во время прохождения такого молекулярного конструктора через канал НТ со схожим поперечным размером происходит почти полное перекрытие просвета НТ, что приводит к существенному изменению ионного тока, текущего через НТ.

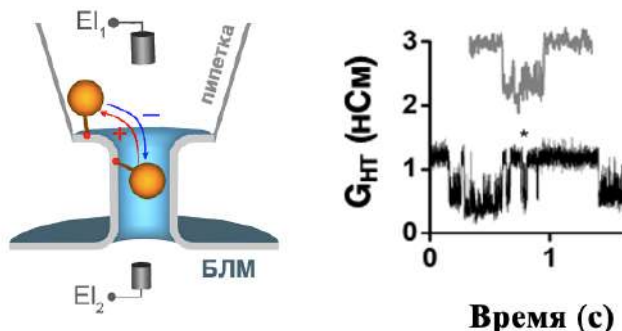


Рис. 1. Детекция молекул тромбина в просвете нанотрубки

Литература

1. *Smeets R.M.M. [et al.] Noise in solid-state nanopores // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008. Vol. 105, No 2. P. 417–421.*

УДК 620.3

Механоиндуцируемая клеточная гибель, вызванная низкочастотным высокоградиентным магнитным

Соловьев В.Д.^{1,2}, Шипунова В.О.^{1,2}, Зелепукин И.В.^{1,2}, Деев С.М.^{1,2}

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

²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

В настоящий момент раковые заболевания являются одними из лидирующих по показателю смертности среди заболевших. В связи с этим, существует необходимость поиска новейших терапевтических подходов с использованием последних достижений бионанотехнологий. Одним из таких подходов является использование низкочастотного высокоградиентного магнитного поля для механоиндуцируемой гибели раковых клеток. Уже существующий более простой метод с применением вращения клеток в ротаторе и одновременного воздействия на них постоянного магнитного поля [1] не дает возможности в дальнейшем экстраполировать полученные данные, а так же, затрудняет создание физических установок, которые необходимы для дальнейшего развития данных типов методик и их *in vivo* применения.

Цель данного исследования заключалась в изучении воздействия низкочастотного магнитного поля на раковые клетки-мишени и усовершенствовании методологии посредством создания контролируемых экспериментальных условий. В качестве первичного усовершенствования было решено использовать пару соленоидов в конфигурации колец Гельмгольца и микроконтроллер (Arduino), что позволило контролировать условия эксперимента и изучать поведение клеток с магнитными наночастицами (МНЧ) в магнитных полях с индукцией до 2 Тл и частотой до 1 кГц. На установке в описанной выше конфигурации были проведены первичные исследования, с использованием модифицированных ТАТ-пептидом [2] (фрагмент оболочечного белка вируса иммунодефицита человека) магнитных наночастиц, что позволило этим частицам проникать через липофильный клеточный барьер и осуществлять доставку больших и малых молекул, и клеток-мишеней аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, которые показали работоспособность данной методики для механоиндуцированной клеточной гибели.

В настоящее время работа направлена на улучшение всех аспектов методики: модификация установки, эксперименты с различными размерами МНЧ, подготовка к проведению *in vivo* экспериментов и комбинация данного подхода с другими терапевтическими подходами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-74-20146 (синтез и модификация наночастиц) и РФФИ №19-29-04012 (культивирование клеток млекопитающих, тесты по цитотоксичности).

Литература

1. Towards nanomedicines of the future: Remote magneto-mechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields, Yuri I. Golovin *a,b*, Sergey L. Gribanovsky *a*, Dmitry Y. Golovin *a*, Natalia L. Klyachko *b,d*, Alexander G. Majouga *b,c*, Alyssa M. Master *d*, Marina Sokolsky *d*, Alexander V. Kabanov *b,d*.
2. Bioconjugate Techniques 2nd Edition Greg T. Hermanson Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA 2008 C.219-223.

УДК 620.3

Многофункциональные биосовместимые наночастицы для фототермической терапии

Е.Н. Комедчикова^{1,2}, В.О. Шипунова^{1,3,4}, С.М. Деев^{1,2,4}

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

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

³ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский институт)

⁴ Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ

Фототермическая терапия относится к одному из наиболее перспективных методов лечения онкологических заболеваний, так как позволяет локально и эффективно вызывать гибель раковых клеток. Её действие основано на свойстве некоторых веществ нагреваться при облучении светом с определённой длиной волны. Благодаря возможности воздействовать светом только на определённый участок организма, негативное воздействие на здоровые клетки минимизируется. При введении в организм наночастицы, выступающие в роли носителя фототермического препарата, представляют собой универсальную платформу для включения большого количества такого соединения и доставки его точно «в цель», а именно, к раковым клеткам. При этом использование наночастиц даёт возможность совместить фототермическую терапию и химиотерапию за счёт включения химиопрепарата внутрь частиц.

В данной работе:

1) Были получены частицы на основе поли-лактид-ко-гликолида (PLGA), сочетающие в себе диагностические и терапевтические свойства. Благодаря содержанию флуоресцентного красителя фталоцианина (Pht) частицы эффективно нагревались при облучении лазером с длиной волны 805 нм. В состав частиц был включён химиотерапевтический препарат иринотекан.

2) Было обнаружено усиление фототермических свойств частиц при включении в состав частиц второго флуоресцентного красителя – нильского синего (Nile Blue, NB), который сам по себе не обладает фототермическими свойствами (рис. 1).

- 3) Были подобраны концентрации красителей, приводящие к наиболее выраженным фототермическим свойствам, а также наиболее сильной флуоресценции частиц.
- 4) Были получены спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции наночастиц.
- 5) Были подобраны условия синтеза частиц с моноклональным антителом Трастузумаб, которые приводят к селективному распознаванию клеток, сверхэкспрессирующих HER2
- 6) Был проведён цитометрический анализ с клеточными линиями с различной экспрессией рецептора.

Таким образом, были синтезированы многофункциональные наночастицы с выраженными фоточувствительными свойствами, распознающие HER2 сверхэкспрессирующие раковые клетки.

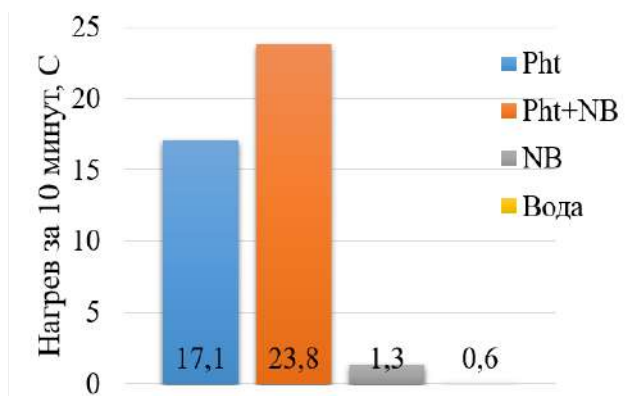


Рис. 1. Усиление фототермических свойств наночастиц при добавлении в их состав второго флуоресцентного красителя. Увеличение температуры раствора, содержащего частицы, за 10 минут при облучении лазером с длиной волны 805 нм.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ 17-74-20146 (синтез наночастиц) и РФФИ 19-29-04012 (культивирование клеток млекопитающих).

УДК 54.057

Многофункциональные наноагенты на основе углеродных квантовых точек и суперпарамагнитных наночастиц

А.Г. Кочарян^{1,2}, А.В. Яременко^{1,2}, М.П. Никитин^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет) ²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Нанотехнология – это современная, быстро развивающаяся область науки, которая нашла свое применение в биомедицине, фармацевтике, электронике, производстве и т. д. Благодаря своим уникальным физическим и химическим характеристикам наночастицы стали незаменимыми инструментами в руках исследователей. Углеродные квантовые точки представляют собой маленькие наночастицы размером около 5 нм, обладающие высокой флуоресцентной активностью и рядом таких преимуществ как фотостабильность, биосовместимость, низкая токсичность, простота синтеза и низкая стоимость. В наномедицине они часто используются как флуоресцентные метки, переносчики лекарств, мультифункциональные тераностические системы [1]. Важно отметить, что обширность и новизна границ нанотехнологий оставляют многие области неисследованными или недостаточно изученными. Несмотря на многообразие полученных углеродных квантовых точек, их применение в основном ограничивается их разнообразностью. Однако зачастую для решения новых научных задач возникает необходимость получения новых типов частиц, совмещающих в себе как свойства углеродных квантовых точек, так и параметры других типов наночастиц.

Данная работа посвящена созданию новых наноагентов из различных наночастиц и квантовых точек, совмещающих в себе полезные свойства квантовых точек и несущих наночастиц. В ходе данного исследования углеродные квантовые точки были синтезированы разными методами, для получения наночастиц с различными физико-химическими свойствами. На следующем этапе были синтезированы наночастицы из гетита и ферригидрита с использованием в процессе синтеза разных восстановителей, которые регулировали форму и свойства полученных наночастиц. Также были

синтезированы цинкосодержащие магнитные наночастицы из оксида железа, которые обеспечивали дополнительные суперпарамагнитные свойства наноагентам из углеродных квантовых точек, таким образом, позволяя использовать бесконтактное манипулирование данными частицами с помощью магнитных полей и осуществлять их визуализацию различными магнитометрическими методами такими как МРТ и МРQ [2]. Далее была исследована сорбция синтезированных углеродных квантовых точек на поверхности наночастиц из оксидов и оксигидроксидов железа с целью их дальнейшей визуализации и квантификации оптическими методами. На последнем этапе данного исследования углеродные квантовые точки были инкапсулированы в белковые наночастицы из бычьего сывороточного альбумина с целью получения больших по сравнению с углеродными квантовыми точками флуоресцентных наноагентов совмещающих в себе преимущества как квантовых точек, так и белковых наночастиц.

Мы полагаем, что в дальнейшем полученные многофункциональные наноагенты могут быть использованы во многих областях биомедицины, например, для оптической томографии злокачественных опухолей и дальнейшей ее терапией с помощью гипертермии, обеспечиваемой магнитными ядрами полученных частиц. Углеродные квантовые точки имеют ряд преимуществ перед стандартными флуорофорными метками такие как более длительный срок службы, что облегчает отслеживание терапевтического агента. В связи с этим, они рассматриваются как нетоксичные аналоги при разработке визуализирующих агентов. Кроме того, полученные наночастицы могут быть связаны с белками и нести на своей поверхности различные лекарственные молекулы, которые потенциально могут быть направленно доставлены в органы-мишени. Также углеродные квантовые точки, конъюгированные с антителами, могут применяться в иммуноокрашивании, разделении клеток и диагностике как злокачественных опухолей, так и других заболеваний.

Литература

1. Du J. *et al.* Carbon dots for in vivo bioimaging and theranostics //Small. – 2019. – Т. 15. – №. 32. – С. 1805087.
2. Shi Y. *et al.* Multifunctional biocompatible graphene oxide quantum dots decorated magnetic nanoplatform for efficient capture and two-photon imaging of rare tumor cells //ACS applied materials & interfaces. – 2015. – Т. 7. – №. 20. – С. 10935-10943.

УДК 577.29

Молекулярное моделирование и атеропротекторные свойства производного хинолин-4-он 3-оксобутаноата *in vivo*

Д.А. Доровский¹, А.Л. Загайко²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Национальный фармацевтический университет (Украина)

Проведен анализ литературы и установлены молекулярные механизмы развития атеросклероза у млекопитающих, установлены ферменты, повышенная активность которых играет ключевую роль в патогенезе данного заболевания, в частности, ДНК-метилтрансфераза 3А [1]. Из библиотеки молекул-производных хинолин-4-он 3-оксобутаноата методом скоростного докинга определена минимальная энергия связывания (скоринговая функция) с активным сайтом фермента ДНК-метилтрансферазы 3А - (- 54,785) для молекулы ZGDZ-018 при помощи Scigress software (рис. 1).

Проведено молекулярное 3D моделирование вещества ZGDZ-018 в активный сайт фермента (рис. 2). Все химические структуры были сгенерированы с использованием пакета ISIS DRAW 4.0 и сохранены в формате .mol, после чего введены в программу SCIGRESS и сохранены в формате .csf. Все структуры были оптимизированы при помощи метода молекулярной механики MM3. Молекулярный докинг был проведен при помощи SCIGRESS Explorer 7.7.

При введении ZGDZ-018 в виде суспензионной лекарственной формы через оральный зонд в желудок сирийских хомячков-самцов с экспериментальным метаболическим синдромом, основные показатели атерогенеза в сыворотке крови были значительно меньше, чем в группе контрольной патологии и после введения препарата сравнения – метформина (рис. 3.) [2].

Для подтверждения специфической активности ZGDZ-018, как ингибитора ДНК-метилтрансферазы 3А, была проведена реакция Грисса на наличие нитратов и нитритов в сыворотке

крови, т.к. гиперактивированная ДНК-метилтрансфераза 3А ингибирует синтез атеропротекторного агента – синтазы оксида азота (рис. 4) [1].

Таким образом, экспериментально доказано, что изученное соединение обладает атеропро-
тективной активностью за счет ингибирования ключевого фермента метилирования ДНК.

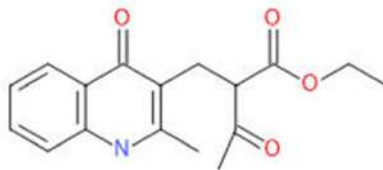


Рис. 1. Химическая структура ZGDZ-018

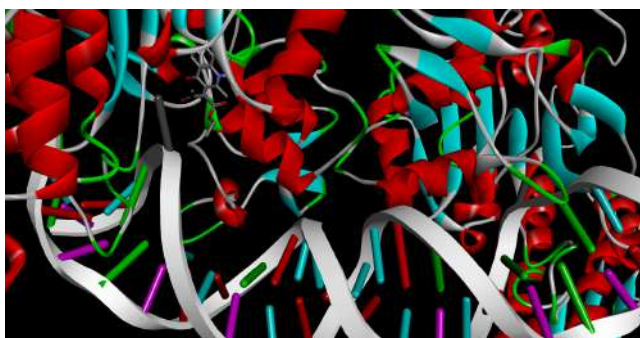


Рис. 2. Вещество ZGDZ-018 в активном сайте фермента DNMT3A (код PDB-bank (5yx2))

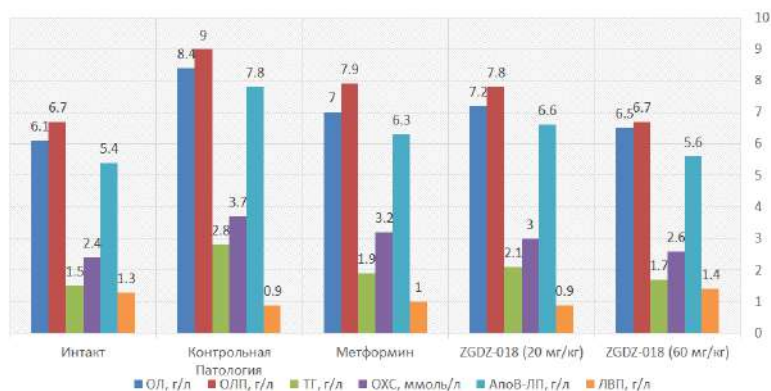


Рис. 3. Липопротеиновый профиль в сыворотке крови сирийских хомяков разных испытуемых групп, где ОЛ – общие липиды, ОЛП – общие липопротеины, ТГ – триглицериды, ОХС – общий холестерин, ЛВП – липопротеины высокой плотности.

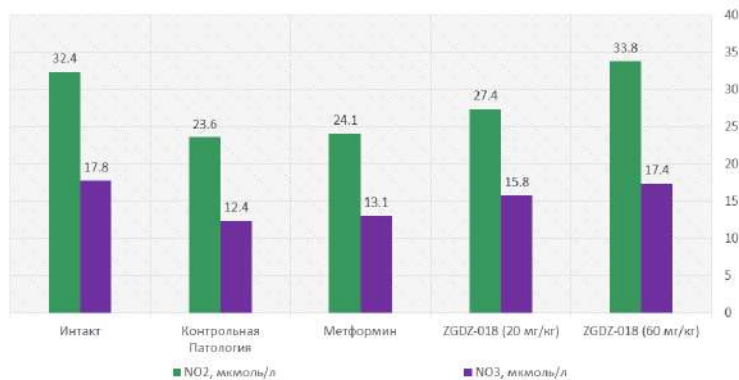


Рис. 4. Показатели содержания нитратов и нитритов в сыворотке крови самцов сирийских хомяков с метаболическим синдромом и при экспериментальном лечении.

Литература

1. Philipp J. R., Silver A., Gopakumar J. Loss-of-Function Mutations in Dnmt3a and Tet2 Lead to Accelerated Atherosclerosis and Convergent Macrophage Phenotypes in Mice// Blood. 132. 2018. P. 745
2. Hayek T., Azrolan N., Verdery R. B. Hypertriglyceridemia and cholesterol ester transfer protein interact to dramatically alter high density lipoprotein levels, particle sizes, and metabolism – studies in transgenic mice// J. Clin. Invest. 1993. №92. P. 1143–1152.

УДК 620.3

Наночастицы магнетита для терапии HER2-положительных опухолей

О.А. Колесникова^{1,3}, В.О. Шипунова^{1,2,4}, В.Д. Соловьев^{1,4}, С.М. Деев^{1,4}

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

⁴Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

HER2-рецептор относится к семейству рецепторных тирозинкиназ, которые регулируют активацию различных клеточных программ: начиная от дифференцировки и пролиферации клеток и заканчивая запуском апоптоза. Амплификация данного рецептора связана с развитием злокачественных новообразований. Для HER2-положительных опухолей характерна агрессивность и высокий уровень метастазирования, что делает их лечение труднодоступным.

Одной из наиболее актуальных областей применения наночастиц является разработка новых подходов к лечению онкологических заболеваний [2,3]. Целью данной работы является получение наночастиц магнетита для терапии HER2-положительных опухолей с использованием низкочастотного магнитного поля. Высокая биосовместимость, магнитные свойства, а также возможность модификации поверхности наночастиц магнетита позволяют использовать их в качестве агентов для онкотерапии [1]. Нами были синтезированы наночастицы магнетита размером 19.7 ± 4.7 нм с помощью микроэмульсионного метода. Была показана стабильность полученных наночастиц в растворе 1M NaCl. Далее мы модифицировали поверхность наночастиц магнетита HER2-распознающим антителом – трастузумабом, осуществляя химическую конъюгацию. Была показана селективность взаимодействия HER2-специфичных наночастиц на примере клеточной линии SK-BR-3 по сравнению с контрольной клеточной линией CHO.

Для визуализации частиц *in vitro* мы окрашивали ранее полученные наночастицы флуоресцентным красителем Cyanine5.5. Эффективность связывания модифицированных наночастиц с HER2-сверхэкспрессирующими клетками была показана на клеточной линии BT474. Методом проточной цитометрии было показано, что флуоресцентные наночастицы высокоселективно связываются с HER2-положительными раковыми клетками в отличие от контрольной линии CHO.

Поверхность флуоресцентных наночастиц магнетита дополнительно модифицировали ТАТ-пептидом для увеличения эффективности проникновения наночастиц в клетку.

Полученные наночастицы использовали для механоиндуцированного разрушения раковых клеток при облучении низкочастотным переменным магнитным полем. Было показано, что при облучении клеток, нагруженных наночастицами, происходит разрыв лизосомальной мембраны, приводящий к высвобождению содержимого лизосом в цитоплазму клетки (рис.1).

Таким образом, нами были получены флуоресцентно меченные наночастицы магнетита, которые можно использовать для механоиндуцируемого уничтожения раковых клеток при облучении низкочастотным магнитным полем.

Исследование поддержано грантом РНФ, проект № 17-74-20146 (синтез наночастиц) и РФФИ №19-29-04012 (культивирование клеток млекопитающих, тесты по цитотоксичности).

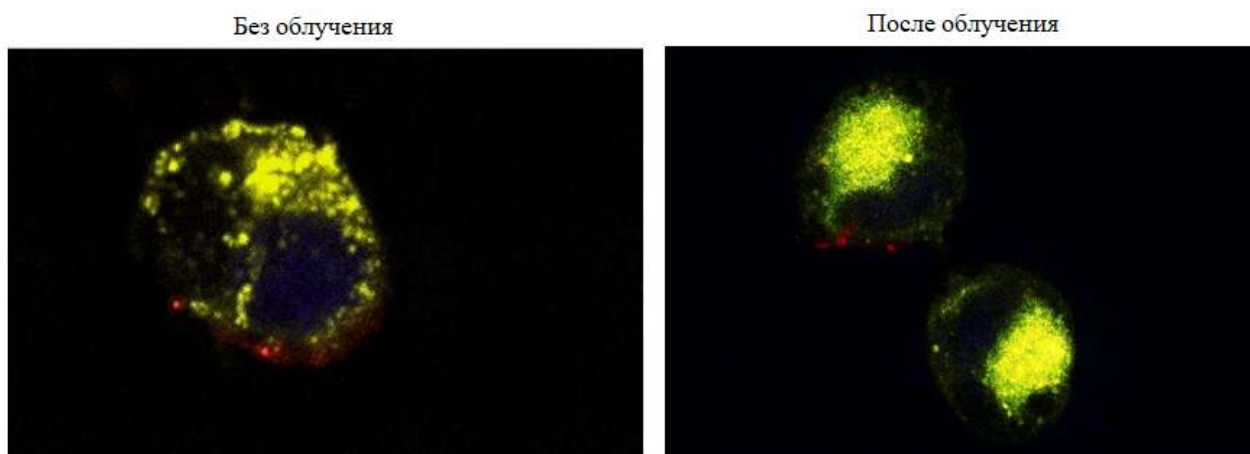


Рис.1 Визуализация разрушения лизосом под воздействием низкочастотного магнитного поля. Слева: раковая клетка, нагруженная наночастицами, без облучения низкочастотным магнитным полем. Справа: раковые клетки, нагруженные наночастицами, после облучения низкочастотным магнитным полем. Лизосомы окрашены желтым цветом (Lysotracker), ядра синим (Hoechst), наночастицы красным (ARA/red).

Литература

1. Shipunova V. O., Kotelnikova P. A., Aghayeva U. F., Stremovskiy O. A., Novikov I. A., Schulga A. A., Deyev S. M. (2019). Self-assembling nanoparticles biofunctionalized with magnetite-binding protein for the targeted delivery to HER2/neu overexpressing cancer cells // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2019. – 469, 450-455.
2. Nikitin M. P., Zelepukin I. V., Shipunova V. O., Sokolov I. L., Deyev S. M., Nikitin P. I. Enhancement of the blood-circulation time and performance of nanomedicines via the forced clearance of erythrocytes // *Nature Biomedical Engineering*. – 2020. – 4(7), 717-731.
3. Shipunova V. O., Komedchikova E. N., Kotelnikova P. A., Zelepukin I. V., Schulga A. A., Proshkina G. M., Prasad P. N. Dual Regioselective Targeting the Same Receptor in Nanoparticle-Mediated Combination Immuno/Chemotherapy for Enhanced Image-Guided Cancer Treatment // *ACS nano*. – 2020.

УДК 620.3

Наночастицы серебра как потенциальный противогриппозный препарат

Аль Фаррух М.^{1,2*}, Скоморохова Е.А.^{1,3*}, Магазенкова Д.Н.¹, Баженова Е.А.¹, Рекстин А.Р.¹,
Киселева И.В.^{1,2}, Пучкова Л.В.³

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины»

²Санкт-Петербургский государственный университет

³Университет ИТМО

*Авторы внесли одинаковый вклад в настоящую работу.

Основными направлениями борьбы с гриппом являются вакцино- и химиопрофилактика. Общими ограничениями обоих подходов являются высокая антигенная изменчивость вируса гриппа и его резистентность к специфическим химиопрепаратам. В последние годы в рамках концепции «вироклетка» [1] разрабатывается новый подход к преодолению вирусных инфекций, который состоит в поиске звеньев в вирус специфическом перепрограммировании, воздействие на которые избирательно подавляет репродукцию вируса, но не влияет на клетку-хозяина. Показано, что для завершения формирования вирионов вируса гриппа А необходимо присутствие в аппарате Гольджи ионов меди [2].

В представленном исследовании изучено *in vivo* влияние дефицита меди в аппарате Гольджи, вызванного введением наночастиц серебра (AgNPs), на репродукцию вируса гриппа.

В нашей работе AgNPs были произведены методом химического восстановления Ag(I) из AgNO₃ до Ag (0). В качестве восстановителя использовали гидразингидрат, стабилизатора – олеат калия. Эпидемический вирус гриппа А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) pdm09 был получен из

Francis Crick Institute (Лондон, Великобритания). В работе использовали самок мышей линии СВА весом 16-20 г. (питомник РАН «Рапполово», Ленинградская область). Исследования были одобрены Этическим комитетом при ФГБНУ «ИЭМ» (заключение №1/20 от 27.02.2020). Мышам вводили внутрибрюшинно AgNPs из расчета 0,2 мг/кг веса ежедневно, начиная с 4 дня до заражения и до последнего дня эксперимента. На пятый день от начала эксперимента мышей заражали интраназально под легким эфирным наркозом 1 ЛД₅₀ вируса гриппа. Оценку эффективности препарата проводили на модели летальной гриппозной пневмонии, развивающейся у мышей на 7-10 сутки после заражения. Учет результатов осуществляли по изменению веса тела, средней продолжительности жизни (СПЖ) животных и летальности.

Относительное содержание оксидазного церулоплазмينا определяли путем окрашивания геля. Для этого аликвоты по 1,0 мкл сыворотки крови электрофоретически разделяли в 8% полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях в системе градиента pH. После электрофореза гель инкубировали с орто-дианзидином, абиогенным специфическим субстратом [3]. Денситометрический анализ гелей осуществляли с помощью программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Иммуноблоттинг с поликлональными моновалентными мышиными антителами к церулоплазмину проводили, как описано ранее [3]. Концентрацию металлов измеряли с помощью атомно-абсорбционного спектрометра с зеемановской коррекцией ZEE nit 650P (Analytik Jena, Германия). Препарат AgNPs содержал единственный симметричный пик поглощения в области 413 нм, указывающий на возбуждение поверхностных плазмонов, типичных для кристаллического серебра. С помощью сканирующей электронной микроскопии было показано, что наночастицы имели сферическую форму и средний диаметр 15 нм. Линейный размер AgNPs был подтвержден данными лазерной дифрактометрии. У мышей, получавших инъекции AgNPs в течение четырех дней до заражения, оксидазная активность церулоплазмينا снижалась практически до нуля. При этом концентрация меди в сыворотке крови снижалась примерно до 300±25 мкг/Л против 620±37 мкг/Л в контроле. При этом экспрессия гена церулоплазмينا не менялась. Полученные результаты показывают, что заражение вирусом гриппа мышей экспериментальной группы осуществлялось на фоне низкого статуса меди.

Из табл. 1, видно, что препарат AgNPs снижал летальность от пневмоний по сравнению с контрольной группой. Средняя продолжительность жизни животных в группах, получавших препарат AgNPs, достоверно увеличивалась и составляла 13,2 дня при 9,8 дней в контрольной группе. Максимальное значение индекса защиты AgNPs в отношении вируса гриппа А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1)pdm09 составило 75%, что сопоставимо с показателями для разрешенного для профилактики гриппа препарата Тамифлю® и позволяет говорить о высокой активности AgNPs [3].

Отмечено выраженное снижение макроскопических поражений легких, оцениваемых на 3 день после заражения (на пике репродукции вируса) в группах, получавших препарат AgNPs, по сравнению с контролем (табл. 1). Вес тела контрольных животных прогрессивно снижался, чего не наблюдалось в группах, получавших препарат.

Таким образом, снижение статуса меди, индуцированное внутрибрюшинным введением AgNPs достоверно, увеличивало выживаемость мышей, зараженных летальной дозой вируса гриппа А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) pdm09 и среднюю продолжительность их жизни и предотвращало развитие патологических поражений легких. Полученные результаты свидетельствуют о том, экспериментальное ограничение доступности меди в аппарате Гольджи можно рассматривать как подход, обеспечивающий защиту организма от гриппозной инфекции вне зависимости от таких ключевых свойств вируса гриппа, влияющих на эффективность противогриппозных мероприятий, как его антигенная новизна и устойчивость к широко применяемым химиопрепаратам.

Группы мышей	n ¹	Поражение легких к 3 дню, %	Летальность к 14 дню		СПЖ ³ , дни	
			%	ИЗ ²	Абс.ч.	Разница ⁴
Контроль	10	40,0	70,0	75%	9,8	3,4
AgNPs	10	6,3	20,0		13,2	

Таб. 1. Протективная активность AgNPs на модели гриппозной инфекции мышей, вызванной одной летальной дозой вируса гриппа

¹Количество мышей в группе. ²Индекс защиты. ³Средняя продолжительность жизни. ⁴Увеличение СПЖ мышей в опытной группе мышей по сравнению с контролем.

Литература

1. Forterre P. The virocell concept and environmental microbiology. The ISME journal. 2013;7(2):233-6.
2. Rupp JC, Locatelli M, Grieser A, Ramos A, Campbell PJ, Yi H, et al. Host cell copper transporters CTR1 and ATP7A are important for influenza A virus replication. Virology journal. 2017;14(1):11.
3. Zarubaev VV, Garshinina AV, Kalinina NA, Shtro AA, Belyaevskaya SV, Slita AV, et al. Activity of Ingavirin (6-[2-(1H-Imidazol-4-yl)ethylamino]-5-oxo-hexanoic Acid) against human respiratory viruses in *in vivo* experiments. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland). 2011;4(12):1518-34.

УДК 57.014

Новые синтетические агонисты никотиновых ацетилхолиновых рецепторов: молекулярный дизайн и активность *in vitro*

М.И. Скрипка¹, Л.В. Сон^{1,2}, Д.С. Кудрявцев², И.Е. Кашеверов², В.И. Цетлин², Н.Д. Тимофеев², И.А. Иванов²

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

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

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) относятся к семейству Cys-петельных рецепторов. Они представляют собой лиганд-управляемые ионные каналы, которые при действии агониста подвергаются конформационным изменениям, что приводит к раскрытию канала, способствующего переносу ионов и изменению мембранного потенциала. В силу широкого распространения подтипов нАХР в ЦНС, ПНС, а также в других тканях организма, они причастны к ряду заболеваний: болезни Альцгеймера, аутизму, хронической боли, шизофрении и др. Это позволяет рассматривать их как терапевтическую мишень при разработке лекарственных препаратов. Панкуроний – это стероидный миорелаксант, широко применяемый при анестезии, механизм действия которого заключается в блокировании мышечных нАХР на постсинаптической мембране [1,2]. С помощью флуоресцентной детекции изменения цитоплазматической концентрации различных ионов можно создать тест-системы, которые позволят выбирать наиболее перспективные вещества (лиганды) нАХР. В данной работе была установлена активность в отношении человеческого нАХР $\alpha 7$ подтипа новых синтетических веществ, предварительно отобранных в процессе нескольких раундов виртуального скрининга и радиолигандного анализа с применением ацетилхолинсвязывающих белков *Lymnaea stagnalis*, *Aplisia californica* и их мутантных форм. Данная тест-система позволяет делать выводы о дальнейшем конструировании синтетических лигандов нАХР, степени их селективности и биобезопасности. Система тестирования была валидирована с использованием коммерчески-доступного лиганда нАХР PNU 282987, продемонстрировавшего активность активатора нАХР $\alpha 7$ подтипа с характерным значением $EC_{50} = 1,27 \pm 0,13$ мкМ. Было приблизительно оценено EC_{50} для синтетических лигандов ТМ и 2АМ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №18-74-10088).

Литература

1. Шелухина И.В., Никотиновые и родственные рецепторы нейромедиаторов: механизмы функциональной активности и новые лиганды: дис. докт. хим.наук: 02.00.10 / Шелухина Ирина Валерьевна. – М., 2019. – 244 с.
2. Kudryavtsev, D., Shelukhina, I., Vulpius, C., Makarieva, T., Stonik, V., Zhmak, M., Ivanov, I., Kasheverov, I., Utkin, Y. and Tsetlin, V., 2015. Natural compounds interacting with nicotinic acetylcholine receptors: from low-molecular weight ones to peptides and proteins. Toxins, 7(5), pp.1683-1701.

УДК 577.3

Новый атмосферный источник ионов для быстрого профилирования биологических объектов на основе ионизации электрораспылением

М.А. Шамраева, Р.Е. Левин, К. В. Бочаров, С. И. Пеков, И. А. Попов

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Для реализации методов масс-спектрометрического профилирования необходимо разрабатывать подходы к ионизации молекул, содержащихся в конкретном биологическом образце. Несмотря на то, что методы масс-спектрометрии являются высокоинформативными и широко используются в научных исследованиях, они достаточно медленно вовлекаются в медицинскую практику. Это обусловлено высокой стоимостью, низкой скоростью анализа и строгими требованиями к подготовке образцов. Одним из решений, которое может способствовать скорейшему внедрению масс-спектрометрии в клинической практике, является разработка методов, основанных на масс-спектрометрии с прямой ионизацией исследуемых образцов, в которых не требуются сложные процедуры подготовки проб, а все манипуляции с образцами проводятся при атмосферном давлении. В данной работе предложен метод ионизации с ионного источника, представляющего собой пористый объёмный пробоотборник, использование которого позволяет не осуществлять предварительную пробоподготовку. Формирование электроспрея с предлагаемого пробоотборника осуществляется посредством подачи на него постоянного высокого напряжения, в результате чего в градиенте электрического и гравитационного поля при достаточно большой напряженности E жидкость вытягивается с пробоотборника (рис. 1), приобретая конфигурацию конуса Тейлора (рис. 2). Формирование конуса Тейлора происходит в локальных минимумах потенциальной энергии проводящей жидкости. При достижении предельных значений E происходит электрический пробой межэлектродного газового промежутка с локализацией искрового разряда на вершине растущего конуса.

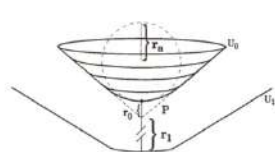
Исследованы особенности ионизации с пористых пробоотборников для растворителей различного состава и модельных растворов. Произведена оценка степени заряженности капель (рис. 3), на основании того, что плотность поверхностного заряда на каплях ограничена критерием устойчивости Рэлея (1) посредством сравнения измеренного тока и максимально возможного тока.

$$I_{\max} = 12\pi T \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \tan(\frac{\pi}{2} - \nu)}{\rho}} \cdot \sqrt{\left(\frac{U_a}{U_T}\right)^2 - 1} \quad (1)$$

$$I = 6\left(\frac{\pi^2}{\rho}\right)^{\frac{2}{5}} \frac{c}{R_f^{\frac{1}{5}}} \sqrt{\left(T \tan\left(\frac{\pi}{2} - \nu\right) \cdot \left(\left(\frac{U_a}{U_T}\right)^2 - 1\right)\right)^3} \quad (2)$$

Показано, что наиболее перспективным является использование пробоотборников с шарообразными краями, вследствие того, что симметричная форма нивелирует вероятность возникновения множественных конусов Тейлора в сравнении с пробоотборниками другой формы [2], [3]. Кроме того, детектирование котинина и никотина с помощью разработанного ионного источника демонстрирует возможности метода прямого профилирования токсинов, лекарственных препаратов в физиологических жидкостях и на коже человека при помощи прямого масс-спектрометрического профилирования и статистического анализа полученных профилей для подтверждения факта приема, исследования метаболизма и детектирования химических соединений в организме человека.

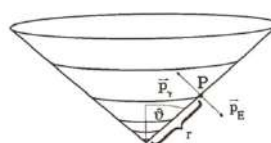
Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и МНТ в рамках научного проекта №19-52-52019.



а)



б)



а)



б)

Рис. 1. а) Поверхность жидкости при напряжении ниже порогового, соответствующего формированию конуса Тейлора [1]; б) Конус Тейлора из раствора 90% MeOH: 10% H₂O с добавлением 0,1% HCOOH с пористого пробоотборника при напряжении 5,5 кВ

Рис. 2. а) Формирование конуса Тейлора при пороговом значении U [1]; б) Конус Тейлора из раствора 90% MeOH: 10% H₂O с добавлением 0,1% HCOOH с пористого пробоотборника при напряжении 7 кВ

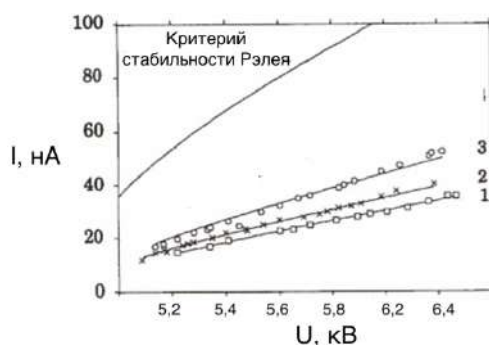


Рис. 3. Вольтамперные характеристики электроспрея для модельных растворов: 1) 90% MeOH:10% H₂O, 2) 10% MeOH:90% H₂O с добавлением 0,1 CH₃COOH, 3) 90% MeOH:10% H₂O с добавлением 0,1 CH₃COOH

Литература

1. Matthias Wilm, Principles of Electrospray Ionization // Molecular & Cellular Proteomics, 2011, 10, 7
2. Max Hecht, Hanno Evard, Kalev Takkis, Rudolf Aro, Rynno Lohmus, Koit Herodes, Ivo Leito Orcid, and Karin Kipper, Sponge Spray - Reaching New Dimensions of Direct Sampling and Analysis by MS // Anal. Chem., 2017, 89, 21, 11592–11597
3. Kerian KS1, Jarmusch AK, Cooks RG, Touch spray mass spectrometry for in situ analysis of complex samples // Anal. Chem., Analyst., 2014, 139(11):2714-20.

УДК 544

Окислительно-восстановительная активность хелатных комплексов тиосемикарбазона Dp44mT в реакциях перекисного окисления липидов

В.Е. Кошман^{1,2}, О.Ю. Селютина^{1,3}, Н.Э. Поляков^{1,3}

¹Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН

²Новосибирский государственный университет

³Институт химии твёрдого тела и механохимии СО РАН

Тиосемикарбазоны (ТСК) вызывают повышенный интерес ученых из различных областей науки, благодаря широкому спектру их химической и биологической активности. В качестве основного механизма их противораковой активности долгое время рассматривалась способность ингибировать рибонуклеотид редуктазу. Но недавние исследования показали, что ТСК, в частности, Dp44mT [1], способны образовывать комплексы с медью внутри лизосом. Эти комплексы вызывают окислительные повреждения мембран лизосом [2]. Этот аспект их биологической активности в настоящее время очень мало изучен и представляет большой интерес для медицинской химии.

В данной работе исследовалась роль образования хелатных комплексов с ТСК Dp44mT в процессах перекисного окисления липидов с участием ионов железа и меди. В качестве модельных систем рассматривались реакции в растворах, мицеллах линолевой кислоты и липидном бислое – бицеллах DLPC/DHPC. Также исследовалось взаимодействие Dp44mT и его хелатных комплексов с липидами и влияние аскорбиновой кислоты на процесс окисления.

Методами ЯМР и оптической спектроскопии изучались окислительно-восстановительные свойства комплексов Dp44mT с железом и медью в реакции перекисного окисления липидов. Обнаружено, что комплексообразование с железом практически полностью ингибирует реакцию перекисного окисления, в то время как комплексы с медью сохраняют окислительную активность. При этом в присутствии аскорбиновой кислоты активность комплексов Dp44mT с железом существенно увеличивается. Анализ оптических данных позволил сделать вывод о том, что усиление активности комплексов в присутствии аскорбиновой кислоты может происходить из-за изменения их структуры.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант №20-33-70019.

Литература

1. Richardson D.R., Kalinowski D.S., Richardson V., Sharpe P.C., Lovejoy D.B., Islam M., Bernhardt P.V. 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones are Potent Iron Chelators and Antiproliferative Agents: Redox Activity, Iron Complexation and Characterization of their Antitumor Activity // J. Med. Chem. 52. 2009. P. 1459–1470.
2. Gutierrez E.M., Seebacher N.A., Arzuman L., Kovacevic Z., Lane Darius J.R., Richardson V., Merlot A.M., Lok H., Kalinowski D.S., Sahni S., Jansson P.J., Richardson D.R. Lysosomal membrane stability plays a major role in the cytotoxic activity of the anti-proliferative agent, di-2-pyridylketone 4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT) // Biochimica et Biophysica Acta. 1863. 2016. P. 1665–1681

УДК 577.325

Определение олигомерного состояния белка по АСМ-данным

М.О. Ершова, И. А. Иванова, Д.И. Ларионов, Т.О. Плешакова, Ю.Д. Иванов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича», Москва

Изучение олигомерного состояния белка играет важную роль в понимании процессов связанных с изменением структуры белка, происходящих в организме. Олигомеризация может быть как физиологически нормальным явлением, так и патологическим. Цель данной работы - определение олигомерного состояния белка по АСМ данным.

В качестве объекта исследований был взят хорошо изученный и доступный гемсодержащий фермент - пероксидаза хрена (ПХ).

По результатам экспериментов были получены АСМ-изображения свежесколотой слюды с сорбированными из буферного раствора ПХ (10^{-7} М) биомолекулами при температуре инкубации 15°C (эксперимент 1) и при 25°C (эксперимент 2), а также из водного раствора ПХ (10^{-7} М) при температуре инкубации 25°C (эксперимент 3). В качестве буфера был взят PBS с концентрацией 2 мМ (при такой концентрации соли, входящие в состав буфера, сорбируются в минимальных количествах, которые не мешают визуализации исследуемого фермента) [1].

При сорбции молекул из буферных растворов фермента на поверхности также сорбируются соли буфера в виде протяженных объектов высотой 0,4–0,6 нм [2]. Для того чтобы при обработке АСМ-данных были учтены только молекулы белка, в расчеты вводился уровень отсечения от 0,8 нм. Результаты экспериментов приведены на графике 1, на котором представлена плотность распределения ПХ по высотам $p(h)$ для трех экспериментов. В таблице 1 приведены вклады каждой экспоненты в $p(h)$ распределение.

Высоты белковых молекул ПХ определялись, как высоты соответствующих максимумов распределения $p(h)$ их изображений по размерам по соотношению:

$$p(h) = \frac{N_h}{N} * 100\% \quad (1),$$

где N_h – это число визуализированных объектов с высотой h , а N – это общее число визуализированных объектов. Аппроксимация экспериментальной зависимости (1) проводилась с помощью функции Гауссиана:

$$p(h) = \sum p_i(h) = \sum_{i=1}^2 \frac{A e^{\frac{-4 \ln(2)(h-h_c)^2}{w^2}}}{\sqrt{\frac{\pi}{4 \ln(2)}}} \quad (2),$$

где A , h_c , w – варьируемые при аппроксимации параметры. Положение максимума распределения объектов по высотам рассчитывалось как максимум аппроксимирующей функции (2) для каждого распределения. Анализ аппроксимации экспериментальных распределений $p(h)$ основан на критерии χ^2 [3].

Для ПХ высота АСМ-визуализированных белков, имеющих схожую молекулярную массу (M_w ПХ ~ 40 кДа) составляет ~ 1,2 нм [2]. В результате аппроксимации экспериментальных зависимостей плотностей распределения АСМ-изображений объектов по высотам $p(h)$ суммой:

1) одной экспоненты для эксперимента 1, что показывает наличие одного распределения $p(h)$ с высотой $h_{\max}=1\pm0,1$ нм (FWHM= $0,4\pm0,1$ нм). Исходя из графика 1, можно сделать вывод, что в эксперименте 1 сорбируется мономерная форма белка ($95\pm5\%$).;

2) двух экспонент для эксперимента 2, что показывает наличие двух распределений: $p_1(h)$ с высотой $h_{\max1}=1\pm0,1$ нм (полной шириной на полувысоте, Full Width at Half Maximum, FWHM₁= $0,5\pm0,1$ нм) и $p_2(h)$ с высотой $h_{\max2}=1,6\pm0,1$ нм (FWHM₂= $0,3\pm0,1$ нм). Исходя из графика 1, можно сделать вывод, что в эксперименте 2 преимущественно сорбируется мономерная форма белка ($65\pm10\%$), но также есть вклад агрегированных структур ($35\pm10\%$).;

3) пяти экспонент для эксперимента 3, что показывает наличие пяти распределений: $p_1(h)$ с высотой $h_{\max1}=1\pm0,1$ нм (FWHM₁= $0,4\pm0,1$ нм), $p_2(h)$ с высотой $h_{\max2}=1,7\pm0,1$ нм (FWHM₂= $0,4\pm0,1$ нм), $p_3(h)$ с высотой $h_{\max3}=2\pm0,1$ нм (FWHM₃= $0,2\pm0,1$ нм), $p_4(h)$ с высотой $h_{\max4}=2,5\pm0,1$ нм (FWHM₄= $0,6\pm0,1$ нм), $p_5(h)$ с высотой $h_{\max5}=3,2\pm0,1$ нм (FWHM₅= $0,4\pm0,1$ нм). Исходя из графика 1, можно сделать вывод, что в эксперименте 3 преимущественно сорбируется мономерная форма белка ($60\pm10\%$), но также существенный вклад вносят агрегированные структуры ($40\pm10\%$), высота которых составляет от $1,7\pm0,1$ нм до $3,2\pm0,1$ нм.

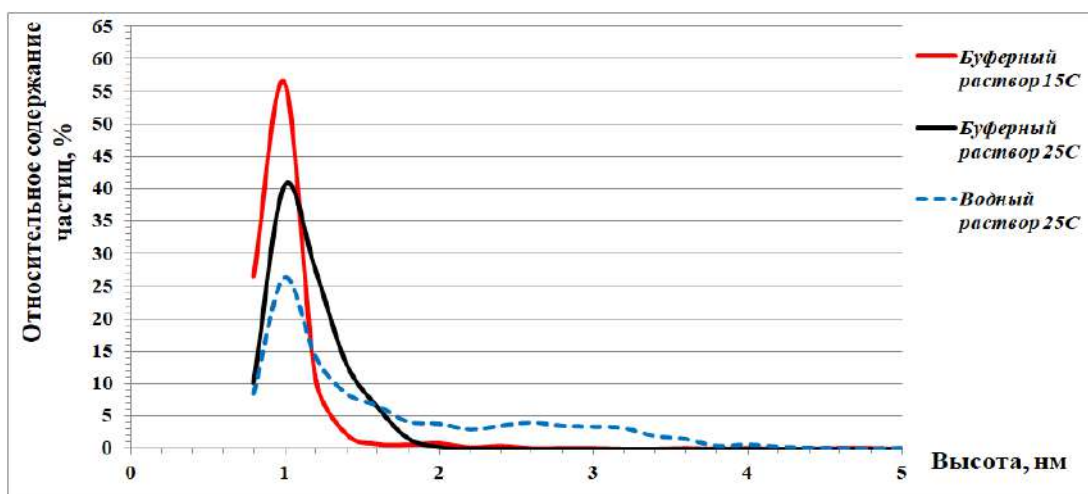


График 1. функция распределения визуализированных объектов по высотам: сплошные линии - эксперимент 1 (буферный раствор ПХ при температуре инкубации 15°C) и эксперимент 2 (буферный раствор ПХ при температуре инкубации 25°C), прерывистые - эксперимент 3 (водный раствор ПХ при температуре инкубации 25°C)

Приведены результаты среднего значения трех технических повторов для каждого образца (см. кодировку цветом в легенде)

Экспериментальные условия	Объекты	$h_{\max}$, нм	FWHM, нм	Доля объектов, %
1. Буферный раствор ПХ при температуре инкубации 15°C	Мономеры	$1\pm0,1$	0,4	95 ± 5
2. Буферный раствор ПХ при температуре инкубации 25°C	Мономеры	$1\pm0,1$	0,5	65 ± 10
	Олигомеры	$1,6\pm0,1$	0,3	35 ± 10
3. Водный раствор ПХ при температуре инкубации 25°C	Мономеры	$1\pm0,1$	0,4	60 ± 10
	Олигомеры	$1,7\pm0,1$	0,4	20 ± 5
	Олигомеры	$2\pm0,1$	0,2	10 ± 5
	Олигомеры	$2,5\pm0,1$	0,6	5 ± 2
	Олигомеры	$3,2\pm0,1$	0,4	5 ± 2

Таб. 1. Значение максимума высоты визуализированных объектов $h_{\max}$, вычисленных по кривым аппроксимации $p(h)$ АСМ-изображений ПХ

Обработка АСМ-изображений проводилась в программном обеспечении Recognite (совместная разработка ИБМХ и НИЯУ МИФИ), Microsoft Excel. АСМ-измерения были выполнены на приборе NTEGRA Aura (NT-MDT, Зеленоград, Россия).

Литература

1. Иванов Ю.Д., Бухарина Н.С., Плешакова Т.О., Французов П.А., Крохин Н.В., Зиборов В.С., Арчаков А.И. АСМ визуализация, измерение активности и физико-химических свойств единичных мономеров и олигомеров ферментов//Биофизика. Т. 56 (5).- М.:РАН, 2011. С.939-944.
2. Ivanov Y. D. et al. AFM imaging of protein Aggregation in Studying the impact of Knotted electromagnetic field on A peroxidase //Scientific Reports. Т. 10 (1). –2020. С. 1-9.
3. Бухарина Н.С. Визуализация и мониторинг активности цитохрома P450 BM3 с использованием атомно-силовой микроскопии//дис. ...канд.б.н.:03.01.04/-М.:2014. С.40-41.

УДК 577.352.43

Оценка биодоступности метформина в условиях модельного липидного бислоя и при изменении диеты экспериментальных животных

О. Ф. Лунева, В. В. Маслова, Г. А. Триандафилова, С. Ю. Солодников

Пермский национальный исследовательский политехнический университет

Проницаемость биомембран зависит от размера молекул, их липофильности и от того, является ли данная молекула субстратом какого-либо транспортного белка. Низкомолекулярные неполярные или нейтральные вещества легче проходят через мембраны за счет диффузии. А гидрофильные или заряженные молекулы диффундировать не могут, поэтому нуждаются в транспортных белках [1].

В данном исследовании изучали биодоступность метформина в опытах *in vitro* с использованием модельного липидного бислоя и *in vivo* при изменении диеты экспериментальных животных. В эксперименте задействовали 20 крыс стока Sprague Dawley (возраст 9 месяцев), которые были разделены на две группы (контрольную и экспериментальную) по 10 особей в каждой: 5 особей женского пола и 5 мужского. Животные контрольной группы получали стандартный корм, животные экспериментальной группы в количестве около 4,4% к стандартному корму, вода была в свободном доступе для каждой группы.

Метформин – это гидрофильное основное соединение класса бигуанидов. При физиологическом pH существует в катионной форме, вследствие чего его пассивная диффузия через барьер кишечника ограничена [2]. Установлено, что в тест-системе Сасо-2 метформин транспортируется через монослой клеток за счет транспортных белков. Основными переносчиками метформина в энтероциты являются белок-транспортёр органических катионов hOCT1 и белок-транспортёр моноаминов плазматической мембраны PMAT. Метформин поступает в энтероциты с помощью катион-селективных транспортёров через апикальную сторону и накапливается в клетках из-за отсутствия подобных транспортёров с базолатеральной стороны [3]. Согласно результатам теста Сасо-2 биодоступность метформина должна быть высокой и в эксперименте *in vivo*.

Анализ биодоступности метформина *in vivo* при изменении диеты экспериментальных животных проводили косвенно, с использованием глюкозотолерантного теста (ГТТ). Мы предположили, что в случае изменения выраженности гипогликемического эффекта метформина в экспериментальной группе по сравнению с контрольной можно сказать, что к-каррагинан повлиял на биодоступность препарата.

Таким образом, согласно литературным данным гипогликемический препарат метформин, несмотря на высокую гидрофильность, хорошо проходит биологический барьер стенки желудочно-кишечного тракта и всасывается, поскольку является субстратом транспортных белков, облегчающих процесс прохождения барьеров. Выводы, полученные с применением метода *in vitro* были косвенно подтверждены *in vivo* с использованием ГТТ, что подчеркивает практическую целесообразность использования теста Сасо-2 для моделирования процесса всасывания и оценки биодоступности соединений. Исходя из результатов ГТТ, можно сделать вывод, что употребление к-каррагинана в течение 7 месяцев в количестве около 4,4% к стандартному корму не уменьшает биодоступность гипогликемического препарата метформина в опыте на возрастных крысах.

Литература

1. Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия. – М.: Мир, 2000. — 496 с.

2. Burt H.J. [et al.]. Metformin and cimetidine: Physiologically based pharmacokinetic modelling to investigate transporter mediated drug–drug interactions // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016. V. 88. P. 70-82.
3. Proctor, William Ross, Iii. A Novel Mechanism for Intestinal Absorption of the Type Ii Diabetes Drug Metformin: Role of Cation-selective Apical Transporters In Paracellular Absorption // Chapel Hill, NC: University of North Carolina at Chapel Hill, 2010. DOI: 10.17615/a54k-5s46

УДК 577.34

Оценка действия гамма-излучения на содержание малонового диальдегида в проростках ячменя посевного (*Hordeum sativum*)

С.О. Астахина, М.М. Рассказова, Л.Н. Комарова

Обнинский институт атомной энергетики – филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

Ионизирующее излучение оказывает сложное воздействие на живые организмы. Кроме прямого действия, выражающегося в повреждении чувствительных структур клеток, также имеет место косвенное воздействие радиации, связанное с образованием радиотоксинов – заряженных ионов, радикалов, высокоактивных веществ перекисного типа. При накоплении радиотоксинов в клетках в первую очередь повреждаются мембранные структуры, и, как следствие, происходит увеличение содержания малонового диальдегида (МДА) – продукта окисления липидов в растительных тканях, что связано с активацией свободнорадикальных реакций в клетках [1].

Целью работы являлась оценка действия гамма-излучения в диапазоне доз от 2 до 50 Гр на количественное содержание МДА у пророщенных семян ячменя посевного (*Hordeum sativum*). Для эксперимента было выбрано 2 сорта – Витязь и Ладный. Облучение семян проводили на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии» (ФГБНУ ВНИИРАЭ) на установке «ГУР-120» с источником излучения ^{60}Co в дозах: 2, 5, 10, 15, 20, 25 и 50 Гр с мощностью дозы 58 Гр/ч. После облучения семена проращивались в рулонных культурах по 30 семян в термостате, по 3 рулона на каждую дозу гамма-излучения. На 5 день проращивания переносили рулонные культуры под фитолампу. На 10 сутки проводили измерения количественного содержания МДА в ростках ячменя посевного с помощью тиобарбитуровой кислоты и последующим определением оптической плотности на фотометре КФК-3-01 при длине волны 532 нм. Экспериментальные данные представлены на рис. 1.

У пророщенных семян сорта Витязь статистически значимое повышение уровня МДА происходит при облучении их в дозах 2, 5, 10, 25 и 50 Гр на 18, 41, 31, 36 и 32% соответственно. У ростков сорта Ладный процесс перекисного окисления липидов идет интенсивнее при гамма-облучении в дозах 2, 5, 10, 25 и 50 Гр на 24, 57, 23, 28 и 42% соответственно (рис.1).

Можно предположить, что при низких дозах с увеличением поглощенной дозы ионизирующего излучения увеличивается количество свободных радикалов, что является не только следствием нарушения антиоксидантно-прооксидантного гомеостаза, а представляет собой важный компонент фенотипической адаптации, так как активные формы кислорода и МДА являются сигнальными молекулами при развитии стрессовой реакции у растений [2]. При облучении в дозах 15 Гр и 20 Гр формируются адаптационно-приспособительные признаки: модулируется антиоксидантная и фитогормональная системы, усиливается интенсивность работы пентозофосфатного пути окисления глюкозы, который участвует в защите клетки от радиационно-индуцированного апоптоза [3], а также увеличивается содержание каротиноидов, защищающих липиды от перекисного окисления за счет «гашения» свободных кислородных радикалов [4]. Дальнейшее увеличение поглощенной дозы ионизирующего излучения вызывает крупномасштабные повреждения в мембранах, нарушая их функции и повышая содержание МДА. Подобный ответ на продукты радиолитической воды влечет за собой деполяризацию мембранного потенциала, синтез стрессовых белков [5] и снижение концентрации хлорофиллов [4].

Таким образом, формирование адаптивных реакций в ответ на облучение зависит от сочетанной работы антиоксидантной системы, фитогормонов и стрессовых белков. Дальнейшее детальное изучение механизмов позволит объяснить эффекты стимуляции при действии стрессовых факторов низкой интенсивности.

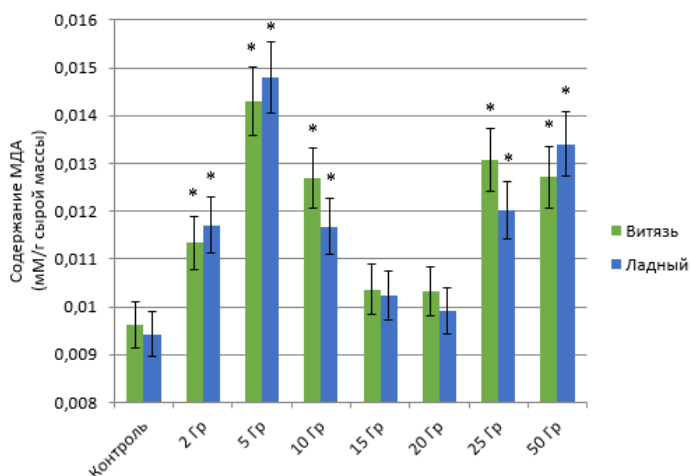


Рис. 1 Зависимость содержания МДА от дозы гамма-излучения на 10 сутки проращивания
* – статистически значимое отличие от контроля при $p < 0.05$

Литература

1. Кияк Н.Я. Действие свинца на интенсивность процессов ПОЛ на разных этапах развития гаметофита мха *Fumaria hygrometrica* Hedw // Современная физиология растений: от молекул до экосистем: тез. докл. науч. конференции. Сыктывкар. 2007. С. 187-189.
2. Ерофеева Е.А. Гормезис и парадоксальные эффекты у растений в условиях автотранспортного загрязнения и при действии поллютантов в эксперименте. дис. д. биол. наук. Нижний Новгород. 2016. 184 с.
3. Волкова П.Ю. Адаптивные реакции растений на действие ионизирующего излучения в низких дозах: дис. д. биол. н. Обнинск. 2020. 390 с.
4. Астахина С.О., Рассказова М.М. Изменение концентрации фотосинтетических пигментов у ячменя посевного *Hordeum sativum* после гамма-излучения // Современные проблемы радиобиологии, радиоэкологии и агроэкологии: сборник докладов международной молодежной конференции. Обнинск, ФГБНУ ВНИИРАЭ. 2019. С. 19-21.
5. Шибарова А.Н. Анализ влияния малых доз ионизирующей радиации на протонную проницаемость и активность АТФазы плазмолеммы клеток высшего растения (*Cucurbita Pepo*): автореф. дис. канд. биол. н. 2006. 24 с.

УДК 543.32/.34

Разработка вычислительной среды для моделирования минерального состава природной воды

С. А. Кузнецова, С. В. Силкин, И. А. Попов, Е. Е. Куликов

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Разрабатывается интегрированная вычислительная среда для моделирования минерального состава поверхностных пресных вод. Интерес к компьютерному моделированию минерального состава пресных вод и предсказанию их свойств был вызван возможностью изучения влияния климатических и антропогенных условий на их состав [1], а также коммерчески значимым приготовлением искусственных минеральных питьевых вод, аналогичных природным. Разработка моделей природной воды также может быть полезной для контроля корректности ее анализа.

Природная вода может быть рассмотрена как сильно разбавленный коллоидный раствор, имеющий определенный минералогический состав с макро- и микропримесями, содержащий также истинно растворенные компоненты [2]. Минеральный состав пресных вод был описан нами в рамках кислотно-основных равновесий, ионных равновесий неорганических веществ с их осадком, равновесий ионов комплексообразователей с лигандами, а также в рамках окислительно-восстанови-

тельных равновесий ионов в зависимости от кислотности среды и окислительно-восстановительного потенциала (ОВП). Данный подход позволяет установить формы нахождения минеральных веществ в воде и предвидеть изменения в ее минеральном составе при варьировании таких параметров, как температура, pH и концентрация растворенного в воде кислорода.

Формы нахождения ионов конкретного химического элемента определяли исходя из диаграмм Пурбе, построенных на основании диаграмм Фроста в кислой и щелочной средах, а также при рассмотрении существующих кислотно-основных равновесий ионов [3,4]. При построении диаграмм Пурбе использовали интегральные параметры качества воды - pH, ОВП и температура, что позволило определить нахождение элементов в определенной ионной форме при данных условиях.

Аналитически обнаруженные ионы природной воды комбинировали в неорганические соединения, исходя из их содержания. Из полученного минерального состава вычисляли удельную электропроводность, используя уравнение Дебая-Хюккеля-Онзагера и уравнение закона Кольрауша. При этом нами учитывалась температурная поправка для определения удельной электропроводности природной воды в естественных условиях. Кислотность предложенного состава определяли как интегральную величину для всех соединений, учитывая наличие в воде гидролизующихся солей, сильных и слабых кислот и оснований, а также нивелирующее действие растворителя.

При моделировании минерального состава природной воды вычисляли величину сухого остатка, учитывая летучие и термически разлагающиеся соединения при кипячении воды. В отличие от летучих соединений, которые не влияют на величину сухого остатка [2,5], для термически разлагающихся соединений были введены коэффициенты, характеризующие убыль массы в ходе анализа, рассчитанные по уравнениям химических реакций термического разложения.

Разработанная на данный момент вычислительная среда позволяет предполагать исключительно минеральный состав модельных растворов пресных вод. Для проверки системы нами был применён метод прямого анализа. Приготовленные по данным моделирования тестовые растворы мы анализировали на интегральные показатели качества природной воды - pH, электропроводность, ОВП и сухой остаток. Удельная электропроводность и pH модельных растворов соответствовали вычисленным величинам. Однако анализ природной воды, взятой для моделирования и выполненный по методикам, описанным в нормативной документации [6-10], показал в ряде экспериментов заниженные величины интегральных показателей. Мы связываем это с более сложным составом природной воды, включающей органические, биогенные и поверхностно-активные вещества [2], которые, связываясь с ионами, приводят к занижению интегральных характеристик по сравнению с расчетными. На данном этапе разработки вычислительной среды не рассматриваются органические соединения, входящие в состав природной воды. Для проверки гипотезы о влиянии веществ-комплексобразователей на интегральные характеристики качества воды, пробы анализировали на наличие АПАВ и определяли перманганатную окисляемость по методикам, описанным в нормативной документации [11,12]. Концентрации АПАВ в анализируемых пробах составляли 0,086-0,12 мг/л, а окисляемость по перманганату калия находилась в диапазоне 7-7,92 мг [O]/л, свидетельствующее о наличии органических примесей в составе природной воды. Модельные растворы не содержали ПАВ, а перманганатная окисляемость составила 5,17 [O]/л, которое связано с неорганическими восстановителями. Это объясняет сходимость результатов вычисления интегральных характеристик качества воды с измеренными нами величинами для модельных растворов, и расхождения соответствующих значений для проб природной воды. Таким образом, следующим этапом разработки вычислительной среды должен являться учет органических соединений в составе природной воды.

Изложенные принципы моделирования минерального состава поверхностных пресных вод были заложены нами в алгоритмы программы, созданной возможностями среды MS Excel. Данная программа опирается в расчётах на базы данных констант диссоциации кислот и оснований, произведений растворимости труднорастворимых соединений, стандартных электродных потенциалов в водных растворах при pH=0 и pH=14, предельных электропроводностей при различных температурах, растворимостей солей при различных температурах, температурах кипения или возгонки веществ и констант нестойкости комплексных соединений, взятых из справочной литературы [13].

Для формализации и унификации первичных данных анализа проб разработано приложение, которое работает совместно с описанной программой моделирования. Их совместное использование представляет собой вычислительную среду для моделирования природной воды, которая позволит при должной доработке осуществлять экспресс-мониторинг пресноводных ресурсов.

Литература

1. Гусева Н. В. Механизмы формирования химического состава природных вод в различных ландшафтно-климатических зонах горно-складчатых областей центральной Евразии. Диссертация на соискание ученой степени доктора геолого-минералогических наук. Томск 2018. 300 с.
2. Лео М.Л. Ноллет, Лин С.П. Де Гелдер. Анализ воды. Справочник: пер с англ. 2-е изд. под ред И.А. Васильевой, Б.Л. Пролетарской -СПб.: "Профессия", 2012 - 920 с.
3. Неорганическая химия: В 3т. / Под ред. Третьякова Ю.Д. Т1: Физико-химические основы неорганической химии: Учебник для студ. высш. учеб. заведений / Тамм М.Е., Третьяков Ю.Д. - М.: "Академия", 2004. - 240 с.
4. Неорганическая химия: В 3т. / Под ред. Третьякова Ю.Д. Т2: Химия непереходных элементов: Учебник для студ. высш. учеб. заведений / Дроздов А.А., Зломанов В.П., Мазо Г.Н., Спиридонов Ф.М. - М.: "Академия", 2004. -368 с.
5. Руководство по анализу воды. Питьевая и природная вода, почвенные вытяжки / Под ред. Муравьева. А.Г. - Изд. 4-е, перераб и дополн. - СПб.: "Крисмас +", 2018. - 360 с.
6. ГОСТ 31868-2012. Вода. Методы определения цветности.
7. ГОСТ 31957-2012. Вода. Методы определения щелочности и массовой концентрации карбонатов и гидрокарбонатов.
8. ГОСТ 18309-2014. Вода. Методы определения фосфорсодержащих веществ.
9. ISO 7027:1990. Качество воды. Определение мутности.
10. ПНД Ф 14.1:2.98-99. МИ жесткости в пробах природных и очищенных сточных вод титриметрическим методом.
11. ГОСТ 31857-2012. Вода питьевая. Методы определения содержания поверхностно-активных веществ.
12. ПНД Ф 14.1:2.4.154-99. МИ перманганатной окисляемости в пробах питьевых, природных и сточных вод титриметрическим методом.
13. Зинченко А.В., Изотова С.Г., Румянцев А.В. и др. Новый справочник химика и технолога. Химическое равновесие. Свойства растворов. - СПб.: "Профессионал", 2004. - 998с.

УДК 577.29

Разработка многофункциональных наноагентов для биовизуализации на основе BRET между люциферазой и квантовыми точками

Е.Е. Маркелова¹, А.А. Сизиков¹, Е.А. Волкова², А. Рынгач¹, А.В. Ярёмченко^{1,3}, Никитин М.П.^{1,3}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова

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

Биоломинесценция и флуоресценция – хорошо изученные типы люминесценции, различные по своему механизму. При биоломинесценции излучение света происходит за счёт выделения энергии в виде фотонов при протекании химической реакции между молекулами фермента и субстрата (люциферина). В то время как при флуоресценции молекулы не могут сами произвести фотоны – сначала должно произойти поглощение агентом внешнего света с меньшей длиной волны (переход в возбуждённое состояние). Явления флуоресценции и биоломинесценции широко применяются в сфере биовизуализации, так как позволяют создавать световые маркеры для картирования расположения заданных клеток, для определения наличия и концентрации заданных веществ. Они незаменимы для таких анализов, как, например, биовизуализация раковых опухолей [1]. Тем не менее, каждое из упомянутых явлений при использовании имеет как ряд достоинств, так и ряд ограничений.

При любом люминесцентном анализе биологического образца присутствует фоновый сигнал, который исходит от рассматриваемого образца. В случае флуоресценции, этот сигнал появляется из-за воздействия внешнего волнового возбуждения не только на введенные флуоресцирующие агенты, но и на флуоресцирующие вещества (например, флавины, липофусцин), которые в норме встречаются в биологических образцах. Серьёзным преимуществом биоломинесценции с использованием системы фермент-люциферин является слабый фоновый сигнал [2], так как при таком анализе не требуется внешнее волновое возбуждение. По этой причине, нижний предел измерений при использовании биоломинесценции ниже, чем при использовании флуоресценции, и, следовательно, биоломинесцентная визуализация позволяет регистрировать меньшие концентрации люминесцирующих агентов.

Недостатком биолюминесцентной визуализации является то, что системы фермент-люциферин излучают свет, лежащий в видимой области спектра, который может быть поглощён хромофорами (например, гемоглобином, меланином) в составе биологических образцов [3]. Спектр поглощения органов и тканей смещён в коротковолновую область, поэтому при измерениях *in vivo* или образцов с большой толщиной, световые волны от биолюминесценции могут затухать до момента достижения поверхности, и вероятность их зарегистрировать понижается. С другой стороны, при флуоресцентной визуализации данная проблема может быть легко решена, так как многие флуоресцирующие агенты, такие как флуоресцентные красители, белки или квантовые точки могут иметь пик излучения в ближней инфракрасной области, где большинство биологических объектов являются оптически прозрачными.

Чтобы собрать воедино преимущества двух подходов к биовизуализации, был рассмотрен биолюминесцентный резонансный перенос энергии (BRET), являющийся своеобразным объединением явлений биолюминесценции и флуоресценции [4]. При BRET происходит взаимодействие люциферина со структурой фермент-флуоресцирующий агент. Энергия, излучаемая в процессе биолюминесценции, остаётся в системе и переносится на флуоресцирующий агент, вызывая протекание флуоресценции. Такая схема анализа даёт слабый фоновый сигнал, а излучаемые световые волны смещены в длинноволновую область и не подвергаются сильному затуханию в образце. В качестве флуоресцирующего агента в такой системе широко распространено применение квантовых точек – группы наночастиц, движение носителей зарядов в которых ограничено по всем трём измерениям. Их преимущество состоит в высоком квантовом выходе и широких возможностях для модификации поверхности [5].

Однако, несмотря на успешность использования BRET, в литературных источниках мало данных об оптимальных условиях построения и применения системы из люциферина и конъюгата люциферазы с квантовой точкой. В данной работе была проведена оптимизация реакции конъюгации квантовых точек с люциферазой NanoLuc [6]. Были использованы квантовые точки, различающиеся по размеру и свойствам, с целью распространения применения данной реакции. Высокая устойчивость люциферазы NanoLuc, по сравнению с другими существующими люциферазами, позволила провести сравнение эффективности (с точки зрения интенсивности BRET) конъюгации в широком диапазоне условий взаимодействия. Люцифераза NanoLuc излучает световые волны длиной 450 нм в процессе реакции с субстратом (коэлютерразином h). В то время как с помощью систем, полученных в данной работе, был произведён переход к волнам длиной около 680 нм. Особенно перспективные результаты показали 2 пары люциферазы с квантовыми точками.

Полученные конъюгаты открывают новые возможности для менее инвазивной оптической биовизуализации *in vivo*, например, при определении наличия и расположения онкологических новообразований. В дальнейшем планируется изучение *in vivo* безопасности полученных конъюгатов и рассмотрение вариантов применения разработанной системы с BRET, путём добавления сторонних молекул в путь переноса энергии между люциферазой и квантовой точкой, с целью использовать полученные агенты в области *in vitro* и *in vivo* биосенсорики.

Литература

1. Choy G., Choyke P., Libutti S.K. Current advances in molecular imaging: noninvasive *in vivo* bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research // *Molecular imaging*. 2003. V. 2. P. 303
2. Troy T. [et al.]. Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models // *Molecular imaging*. 2004. V. 3. P. 9
3. Zhao H. [et al.]. Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection *in vivo* // *Journal of biomedical optics*. 2005. V. 10. P. 041210
4. Xu Y., Piston D.W., Johnson C.H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999. V. 96. P. 151
5. Xia Z., Rao J. Biosensing and imaging based on bioluminescence resonance energy transfer // *Current opinion in biotechnology*. 2009. V. 20. P. 37
6. Hall M.P. [et al.]. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate // *ACS chemical biology*. 2012. V. 7. P. 1848

Разработка прибора и программного обеспечения для обработки экспериментальных данных по изучению воздействия космических лучей на нематоды

Caenorhabditis elegans

М.В. Будаева¹, Е.И. Марусич¹, В.С. Чернышев^{1,2}, И.С. Сивцев¹, Д.В. Гурьев³, С.В. Леонов^{1,4}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Сколковский Институт Науки и Технологий

³Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России

⁴Институт Биофизики клетки РАН

Комбинированное воздействие пониженной гравитации и галактических космических лучей на живые объекты различного уровня организации является важным предметом изучения в науке о космосе. Вместе с тем, воздействие окружающей среды во время космических полетов может вызывать изменения в живых организмах, подобные изменениям, происходящим во время старения. Эти процессы взаимосвязаны на клеточном уровне и характеризуются изменениями ДНК, особенно очевидными под влиянием оксидативного стресса и воздействия свободных радикалов. Круглые черви нематоды *Caenorhabditis elegans* - широко используются как модельные животные в исследованиях, направленных на исследование факторов, приводящих к увеличению продолжительности жизни [1]. Эта тема приобретает наибольшую актуальность в связи с возросшим интересом в последнее время к вопросам космической биологии [2].

В данной работе представлена стратегия подготовки экспериментов на Земле идентичных тем, которые будут проводиться в космосе, на модели нематод *C. elegans*. Для постоянного мониторинга состояния нематод как на Земле, так и после полета в космос с помощью 3D-принтера был изготовлен новый прибор - оптимизированный аналог "The C Elegans Lifespan Machine" (Университет Гарварда, Бостон, США). Кроме этого, было разработано программное обеспечение к этому устройству. Данный прибор позволяет снимать видео испытываемых объектов в режиме реального времени, а программное обеспечение, дает возможность для анализа снятых видео данных. Для обработки видео создана оригинальная программа, написанная на языке Python 3. с использованием библиотек компьютерного зрения и машинного обучения. Также, для расширения спектра возможностей анализа состояния нематод были написаны дополнительные алгоритмы в программе CellProfiler.

Это позволит провести серии экспериментов на Земле в условиях, приближенных по свойствам к космическим. Далее нематоды будут отправлены орбиту Земли с нашим прибором для наблюдения за живыми объектами. Более того, будет протестировано влияние различных геронпротекторов на способность защиты нематод от условий пониженной гравитации и галактических космических лучей. Применение новых систем обработки экспериментальных данных, разработанных для проведения экспериментов в космосе, получение первичных результатов экспериментов на Земле, аналогичных тем, что будут выполнены в космической среде, предоставляет новые перспективы в изучении влияния космоса на состояние живых объектов.

Литература

1. Johnson T.E., Nelson G. A., *Caenorhabditis elegans*: A model system for space biology studies, *Experimental Gerontology*, Volume 26, Issues 2–3, 1991, P.299-309
2. Higashibata A., Hashizume T., Nemoto K., Microgravity elicits reproducible alterations in cytoskeletal and metabolic gene and protein expression in space-flown *Caenorhabditis elegans*, *Nature npj microgravity* volume 2, Article number: 15022 (2016)

Роль нативно неупорядоченных белков в процессах старения

Мануйлов В.Д.¹, Ильинский Н.С.¹, Уверский В.Н.^{1,2}

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

²Морсанский медицинский колледж

Существуют клеточные процессы, нарушение которых определяет развитие старения. К ним относятся: нестабильность генома, эпигенетические изменения, потеря протеостаза, дисфункция митохондрий и нарушение клеточного метаболизма [1]. Потеря протеостаза определяет развитие многих возрастных заболеваний. Нейродегенеративные заболевания развиваются из-за накопления токсичных агрегатов белков (бета-амилоид, тау-белок, альфа-синуклеин, супероксид дисмутаза, гентингтин, прионный белок PrP^{Sc}), принадлежащих к категории внутренне неупорядоченных белков [2]. Известно, что белки этой категории играют важные роли в большом количестве клеточных процессов.

Актуально выяснить, насколько внутренняя неупорядоченность представлена в белках, связанных со старением, в каких клеточных процессах она наиболее выражена. Ранее подобный анализ был проведен для белков, вовлеченных в болезнь Альцгеймера [3], лобно-височную долевую дегенерацию, боковой амиотрофический склероз [4].

В список белков, связанных со старением, выбранных для анализа в этой работе, были включены 158 белка. Из них 42 белка одновременно присутствуют в базах данных GenAge, Gene Ontology (белки, аннотированные 'aging') и предсказания алгоритмов машинного обучения (белки, имеющие предсказанные значения выше порогового в 0.24) [5]. Также в список были добавлены 117 белков, выбранные на основе обзорной статьи по протеомике и старению (белки, встречающиеся в отобранных исследованиях не менее 4 раз) [6]. Для полученной выборки из 158 белков были проанализированы показатели разупорядоченности - предсказанный процент внутренней неупорядоченности (ППВН, на основе 6 алгоритмов), MobiDB, MoRF. В результате оказалось, что из выбранных 158 белков 30.4% лежат в промежутке значений ППВН от 0 до 10%, 38.6% белков - от 10 до 30%, и 31% белков - более 30%. Таким образом, около 70% рассматриваемых белков являются частично или полностью внутренне неупорядоченными. Этот результат был также подтвержден с помощью другого вычислительного метода, использующего заряд и гидрофобность белка.

Анализ также показал, что белки, более связанные со старением (предсказанные значения > 0.24), имеют среднее значение внутренней неупорядоченности в 1.5 раза выше, чем белки, менее связанные со старением (предсказанные значения < 0.24). Кроме того, была проведена классификация рассматриваемых белков по типу 'фермент/не фермент'. Анализ полученных данных показал, что для ферментов, участвующих в старении, более характерно наличие четкой структуры: из них 50.9% принадлежит промежутку значений ППВН от 0 до 10%, 43.4% - промежутку от 10 до 30% и 5.7 % ферментов - более 30%.

Полученные данные свидетельствуют, что внутренняя неупорядоченность характерна для белков, связанных со старением. Знание уровня внутренней неупорядоченности и набора функций рассматриваемых белков позволит углубить понимание механизмов старения и наметить пути его замедления.

Литература

1. López-Otín C. *et al.* The hallmarks of aging //Cell. – 2013. – Т. 153. – №. 6. – С. 1194-1217.
2. Uversky V. N., Fink A. L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2004. – Т. 1698. – №. 2. – С. 131-153.
3. Gadhave K. *et al.* The dark side of Alzheimer's disease: unstructured biology of proteins from the amyloid cascade signaling pathway //Cellular and Molecular Life Sciences. – 2020. – С. 1-46.
4. Uversky V. N. The roles of intrinsic disorder-based liquid-liquid phase transitions in the "Dr. Jekyll–Mr. Hyde" behavior of proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration //Autophagy. – 2017. – Т. 13. – №. 12. – С. 2115-2162.
5. Kerepesi C. *et al.* Prediction and characterization of human ageing-related proteins by using machine learning //Scientific reports. – 2018. – Т. 8. – №. 1. – С. 4094.
6. Johnson A. A. *et al.* Systematic review and analysis of human proteomics aging studies unveils a novel proteomic aging clock and identifies key processes that change with age //Ageing Research Reviews. – 2020. – С. 101070.

Роль трансмембранного домена в автофосфорилировании рецептора, подобного рецептору инсулина (IRR)

А.А. Гавриленкова^{1,2}, О.В. Серова², А.Р. Азишева², А.Л. Калининченко², Е.А. Ганцова², А.С. Горященко², Э.В. Бочаров², И.Е. Деев², А.Г. Петренко²

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Рецептор, подобный рецептору инсулина, принадлежит семейству рецепторных тирозинкиназ (RTKs), которые играют ключевую роль в развитии и дифференцировке клеток. RTKs состоят из 3-х частей: внеклеточной части, которая отвечает за связь с лигандом, трансмембранного домена, и внутриклеточной части, участвующей в фосфорилировании субстратов. В лаборатории клеточной биологии рецепторов ИБХ РАН было показано, что IRR является внеклеточным щелочным сенсором и участвует в регуляции секреции бикарбоната почками [1]. Недавние исследования указывают на важную роль трансмембранного домена (ТМ) в лиганд-зависимой активации рецепторов [2]. В неактивном состоянии ТМ-домены находятся в конформации, препятствующей взаимодействию цитоплазматических частей молекулы. При связывании лиганда, конформация рецептора меняется. В результате внутриклеточные тирозинкиназные домены сближаются и фосфорилируют друг друга, вызывая клеточный ответ.

Для того, чтобы изучить роль трансмембранного домена в рН-зависимой активации рецептора IRR, нами были получены мутантные формы рецептора, содержащие одинарные и двойные замены в трансмембранном домене. Клетки линии НЕК293 трансфецировали плазмидными конструкциями, кодирующими мутантные формы IRR с заменами P928A, T927I-G930I, V929E-G930R, V929E, G930R, F942I-F943I, A938E-A939R, A938E, A939E. Затем клетки инкубировали в среде F-12, с добавлением 40 мМ Tris-HCl с рН 7,4 и 9,0, клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота. В результате эксперимента мы получили следующие данные. Мутации P928A, T927I-G930I, F942I-F943I не влияли на характер активации рецептора. Двойная замена V929E-G930R приводила к фосфорилированию рецептора при рН 7,4 в отличие от рецептора дикого типа, который фосфорилируется при рН > 7,9. При этом мутант V929E-G930R не реагировал на щелочную обработку и имел максимальный уровень активации при нейтральном значении рН. Единичные замены V929E и G930R также приводили к автофосфорилированию рецептора при рН 7,4. Но в отличие от двойного мутанта, мутанты с одиночными заменами активировались при повышении рН. Такой же характер активации рецептора наблюдался для двойного мутанта A938E-A939R. Мутант A938E-A939R был автофосфорилирован при нейтральном рН с сохранением свойства чувствительности к рН. Одиночный мутант A938E был немного фосфорилирован при рН 7,4, в отличие от одиночного мутанта A939R. Мы предполагаем, что двойные замены V929E-G930R и A938E-A939R приводят к димеризации трансмембранных доменов рецептора и как следствие к автофосфорилированию внутриклеточных частей рецептора в среде с нейтральным значением рН.

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

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) гранты № 17-00-00486, 19-04-01042, 19-04-00815, 19-34-90177

Литература

1. Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P., Serova O.V., Popova N.V., Zozulya S.A., Burova E.B., Houillier P., Rzhetsky D.I., Berchatova A.A., Murashev A.N., Chugunov A.O., Efremov R.G., Nikol'sky N.N., Bertelli E., Eladari D., Petrenko A.G. Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor. *Cell Metab.* 2011, 13(6), 679-89.
2. Bocharov E.V., Sharonov G.V., Bocharova O.V., Pavlov K.V. Conformational transitions and interactions underlying the function of membrane embedded receptor protein kinases. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2017, 1859(9 Pt A), 1417-1429.

Серебряные наночастицы для адресной фототермической терапии раковых заболеваний

М.М. Белова^{1,2}, В.О. Шипунова^{1,2,3}, С.М. Деев^{1,3}

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

³Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

В настоящее время разработка тераностических средств для терапии и диагностики социально значимых заболеваний является одним из важнейших направлений биомедицинских исследований. В частности, активно ведутся работы, направленные на создание лекарств для борьбы с раковыми заболеваниями.

Перспективными агентами для разработки методов тераностики являются металлические наночастицы (НЧ), обладающие свойством локализованного поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР) (1). Такие НЧ являются мультифункциональными агентами, так как сочетают в себе как диагностические, так и терапевтические функции (2). Для биобезопасного получения НЧ перспективным методом является “зеленый” синтез с использованием вторичных метаболитов лекарственных растений в качестве восстанавливающих металлы агентов (3). Полученные таким методом НЧ являются экологичными, недорогими и нетрудоемкими в синтезе благодаря низкой стоимости растительной продукции и короткой продолжительности, и относительной простоте синтеза. Также такие частицы позволяют модифицировать их нацеливающими агентами для доставки к клеткам-мишеням за счет высокой химической активности их поверхности и применять их для детекции и селективного уничтожения клеток посредством гипертермии и благодаря наличию в их структуре биологически-активных веществ из лекарственных растений.

В данной работе методом «зеленого» синтеза с использованием водных экстрактов интактных растений лаванды узколистной были получены серебряные НЧ. Коллоидно стабильные в фосфатно-солевом растворе НЧ были охарактеризованы методами спектрофотометрии, динамического рассеяния и сканирующей электронной микроскопии. Нами было установлено, что НЧ обладают оптимальным для онкотераностики размером (36.4 ± 1.6 нм) и однородной сферической формой, а также проявляют цитотоксические свойства против линии клеток аденокарциномы молочной железы человека (SK-BR-3) и аденокарциномы яичника человека (SKOV3-1ip). При модификации поверхности НЧ бычьим сывороточным альбумином (БСА), частицы не оказывали цитотоксического действия на все изученные клеточные линии.

Нами было показано, что синтезированные НЧ серебра могут быть использованы для локальной гипертермии: при облучении НЧ синим светом с $\lambda = 465$ нм при мощности 95 мВ/см^2 наблюдалось увеличение температуры раствора с наночастицами на 10.1°C по сравнению с контрольным. Также при облучении наблюдалось снижение пролиферативной активности клеток линии SKOV3-1ip, меченных данными наночастицами. Результаты МТТ-теста показали, что выживаемость клеток данной линии уменьшилась в среднем на 43.1 % при относительно низких концентрациях НЧ ($0.333 \dots 0.004$ г/л).

Полученные НЧ, модифицированные аффибоди $Z_{\text{HER2}:342}$ для таргетного воздействия на HER2-сверхэкспрессирующие раковые клетки, демонстрируют противораковую эффективность *in vivo* на моделях ксенографтных опухолей. При лечении мышей линии BALB/c Nu/Nu внутриопухолевыми инъекциями адерсных НЧ в сочетании с внешним облучением опухоли синим светом показана полная ремиссия (рис. 1).

Таким образом, полученные нами серебряные НЧ являются перспективным средством для локальной фототермической терапии солидных опухолей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантов РНФ 17-74-20146 (синтез наночастиц, *in vivo* эксперименты) и РФФИ 20-34-70136 (*in vitro* эксперименты).

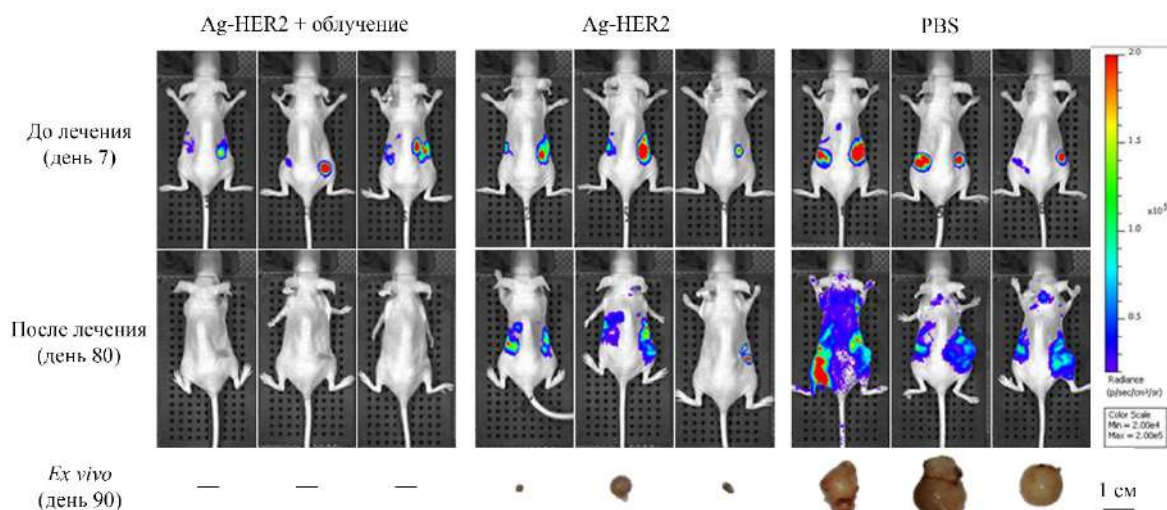


Рис. 1. Визуализация BT/NanoLuc опухолей ксенографтной модели до лечения (день 7) и после лечения (день 80) и первичного опухолевого очага *ex vivo* (день 90) при лечении внутриопухолевыми инъекциями PBS, НЧ, модифицированных аффибоди Z_{HER2:342} (Ag-HER2), без облучения и Ag-HER2 с облучением синим светом. Шкала 1 см

Литература

1. Sui M. *et al.* Strongly confined localized surface plasmon resonance (LSPR) bands of Pt, AgPt, AgAuPt nanoparticles // Scientific Reports. – 2019. – Т. 9. – 16582.
2. Shipunova V. O. *et al.* Versatile Platform for Nanoparticle Surface Bioengineering Based on SiO₂-Binding Peptide and Proteinaceous Barnase*Barstar Interface // ACS applied materials & interfaces. – 2018. – Т. 10 – №. 20. – С. 17437-17447.
3. Belova M. M. *et al.* "Green" synthesis of cytotoxic silver nanoparticles based on secondary metabolites of *Lavandula angustifolia* Mill. // Acta Naturae. – 2019. – Т. 11. – № 2 (41). – С. 47–53.

УДК 620.3

Система адресной доставки лекарственных средств на основе MIL-101 (Fe)

О.Ю. Грязнова^{1,2}, И.В. Зеленикин^{1,2}, С.М. Деев^{1,2}

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

² Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

Одним из вызовов современной медицины является диагностика и лечение рака легкого, т.к. он является наиболее часто встречающимся раковым образованием, а также находится на первом месте среди онкозаболеваний по количеству смертей в год. Используемые в химиотерапии лекарственные вещества оказывают воздействие не только на раковые клетки, но и на здоровые ткани, в связи с чем встает вопрос о создании и применении средств адресной доставки препаратов в легкие. Одним из претендентов на эту роль являются наночастицы (НЧ) металл-органических каркасных структур типа MIL-101 (Fe) из-за их высокой сорбционной ёмкости, а также биосовместимости, биodeградируемости и низкой токсичности (1).

В данной работе НЧ MIL-101 (Fe) были получены сольвотермальным методом. Было показано, что данные частицы разрушаются в изотоническом натрий-фосфатном буфере pH 7,4, за счет замещения линкера в кристаллической структуре на фосфатную группу с высвобождением линкера в раствор. Была изучена кинетика деградации НЧ с помощью оптоакустического метода, а также показано, что на скорость разрушения структур влияет наличие белков в буфере.

Для изучения потенциала использования НЧ в качестве средств доставки была исследована их сорбционная ёмкость для молекул различной природы.

In vivo эксперименты по биораспределению НЧ MIL-101 (Fe) показали, что частицы накапливаются в легких. Этот факт, а также их высокая сорбционная ёмкость, например, доксорубина, доказывает, что НЧ MIL-101 (Fe) можно использовать для терапии метастаз в легких. На модели

меланомы было показано, что такое лечение уменьшает количество опухолевых узлов, а также размер онкообразований по сравнению с лечением доксорубицином.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-72-30012.

Литература

1. Horcajada P. et al. Porous metal–organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nature Mater* 9, 172–178 (2010).

УДК 577

Создание тест-системы, основанной на микобактериальных MmpS5-MmpL5 транспортерах, для скрининга потенциальных антимикобактериальных препаратов

С.Г. Фролова^{1,2}, К.В. Шур¹, В.Н. Даниленко¹, Д.А. Маслов¹

¹Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

Возникновение и распространение штаммов *M. tuberculosis* с множественной и широкой лекарственной устойчивостью требует новых подходов в дизайне и биоскрининге новых противотуберкулезных препаратов. Система MmpS5-MmpL5 обеспечивает устойчивость микобактерий к широкому спектру препаратов таких как, бедаквилин [1] и клофазимин [2], азолы [3], производные тиацетазона и имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразины [4]. Тестирование кандидатов в противотуберкулезные препараты на возможную подверженность эффлюксу, опосредованному системой MmpS5-MmpL5, на ранних стадиях разработки, позволит избежать перекрестной лекарственной устойчивости с упомянутыми выше препаратами. Мы использовали суицидную векторную систему p2NIL/pGOAL19 для конструирования на основе *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 рекомбинантного штамма, несущего делецию 2828 п.о. в опероне *mmpL5-mmpS5* – *M. smegmatis* Δ mmp5. Рекомбинантный штамм оказался гиперчувствительным к имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразинам - 3а, 3с, 3h и 3п [5] по сравнению со штаммом дикого типа: минимальные ингибирующие концентрации (МИК) соединений 3а и 3п были в 2 раза ниже в отношении *M. smegmatis* Δ mmp5, в то время как соединения 3с и 3h имели в 4 раза более низкие показатели МИК (Таблица 1). Нами также получены конструкции для сверхэкспрессии в штамме *M. smegmatis* Δ mmp5 генов системы MmpS5-MmpL5 *M. tuberculosis* (rv0677c-rv0676c). Сравнение чувствительности *M. smegmatis* mc2 155 и *M. smegmatis* Δ mmp5 к кандидатам в противотуберкулезные препараты может быть использовано в качестве тест-системы для определения возможной роли системы транспортеров MmpS5-MmpL5 в развитии лекарственной устойчивости на ранних стадиях скрининга. Помимо этого, штамм *M. smegmatis* Δ mmp5, сверхэкспрессирующий гены rv0677c-rv0676c может быть использован для поиска ингибиторов данных транспортеров, в качестве средств для преодоления опосредованной ими резистентности.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант РФФИ 17-75-20060-П).

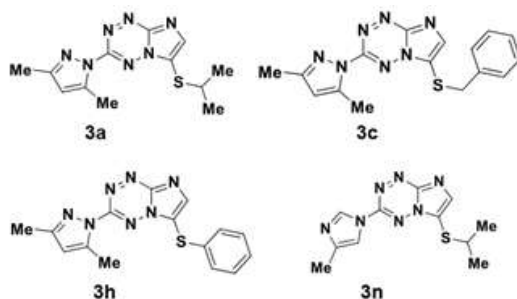


Рис. 1. Исследуемые имидазо[1,2-*b*][1,2,4,5]тетразины

Соединение	МИК, мкг/мл	
	<i>M. smegmatis</i> mc2 155	<i>M. smegmatis</i> Δ mmp5
3а	128	64
3с	>128	32

3h	64	16
3n	64	32

Таб. 1. Результаты измеренных МИК исследуемых соединений

Литература

1. K. Andries [et al.], "Acquired resistance of Mycobacterium tuberculosis to bedaquiline," *PLoS One*, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0102135.
2. M. Richard, A. V. Gutiérrez, A. J. Viljoen, E. Ghigo, M. Blaise, and L. Kremer, "Mechanistic and structural insights into the unique TetR-dependent regulation of a drug efflux pump in Mycobacterium abscessus," *Front. Microbiol.*, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00649.
3. A. Milano [et al.], "Azole resistance in Mycobacterium tuberculosis is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system," *Tuberculosis*, 2009, doi: 10.1016/j.tube.2008.08.003.
4. D. A. Maslov, K. V. Shur, A. A. Vatlin, and V. N. Danilenko, "Mmps5-MmpL5 transporters provide Mycobacterium smegmatis resistance to imidazo[1,2-b][1,2,4,5]tetrazines," *Pathogens*, 2020, doi: 10.3390/pathogens9030166.
5. D. A. Maslov [et al.], "Synthesis and antimycobacterial activity of imidazo[1,2-b][1,2,4,5]tetrazines," *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.05.081.

УДК 57.021

Сравнение и анализ различий биологических свойств магнитных наночастиц *in vitro*

А.Р. Илясов, Т.Р. Низамов

Национальный исследовательский технологический университет МИСиС

В работе было исследовано воздействие магнитных наночастиц, покрытых оксидом кремния, на опухолевые клетки РС3 в низкочастотном магнитном поле. Было выявлено значительное снижение выживаемости клеток относительно контрольной группы с наночастицами без оболочки. По результатам серии проведенных экспериментов и анализа научных публикаций было предложено объяснение обнаруженному явлению – выживаемость клеток зависит от количества частиц и степени их агрегации внутри везикул клеток.

В лаборатории были получены наночастицы диаметром 10 нм из магнетита (Fe_3O_4). После этого одна группа наночастиц была модифицирована оболочкой из диоксида кремния (SiO_2), а другая нет (шифры образцов наночастиц 10MSP и 10MP, соответственно). Для обеспечения стабильности в водных растворах обе группы наночастиц были модифицированы полиэтиленгликолем (ПЭГ). Тестом на цитотоксичность полученных образцов служил стандартный спектрофотометрический MTS метод. На первый день клетки культуры РС3 высаживались в 96-ти луночный планшет в концентрации 10 тысяч/лунка. На второй день в лунки добавлялись наночастицы в концентрации 150 мкг/мл. Спустя 24 часа инкубации наночастиц с клетками, планшеты были помещены в низкочастотное переменное магнитное поле с амплитудой 100 мТл и частотой 180 Гц. На 4 день эксперимента в лунки был добавлен MTS краситель. Полученные результаты демонстрировали отсутствие влияния наночастиц без оболочки из диоксида кремния в низкочастотном магнитном поле на выживаемость клеток. В то время как, выживаемость клеток, к которым добавляли наночастицы с SiO_2 оболочкой, значительно снижалась относительно контроля (лунки с клетками, к которым не добавляли никаких наночастиц) до 35 % (рисунок 1).

Был проведен обширный обзор научных публикаций на данную тему, по результатам которого выдвинута гипотеза, потенциально объясняющая наблюдаемый эффект. Для её подтверждения приготовили блоки из эпоксидной смолы с клетками, инкубированными с наночастицами. Срезы данных блоков изучили методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Выяснилось, что частицы без жесткой оболочки из оксида кремния в везикулах клеток агрегировали значительно более плотно (рисунок 2). Расчет в компьютерной модели показал, что более плотная агрегация наночастиц способствует уменьшению кинетической энергии агрегатов в условиях воздействия магнитного поля. То есть частицы с оболочкой из оксида кремния сильнее воздействовали на клетки вследствие их менее плотной агрегации.

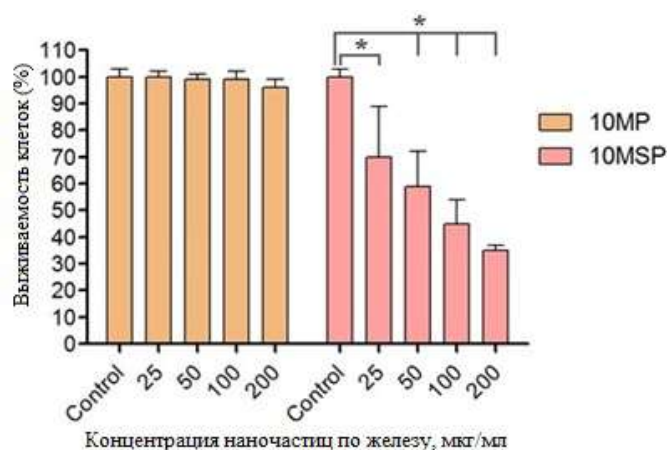


Рис. 1. Выживаемость клеток культуры РС3 в низкочастотном магнитном поле с наночастицами 10MSP (с оболочкой из оксида кремния) и 10MP (без оболочки) при времени инкубации 48 часов

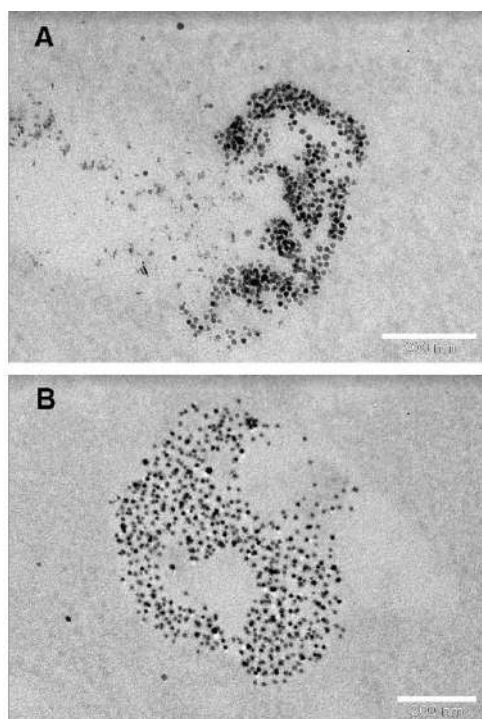


Рис. 2. ПЭМ-изображение наночастиц 10MSP и 10MP внутри клеток РС3

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-03-00967.

УДК 577.322.53

Структурное разнообразие и динамика «трехпетельных» белков человека по данным ЯМР-спектроскопии

*М.В. Кочаровская^{1,2}, А.С. Парамонов², А.В. Царёв^{1,2}, Д.С. Кульбацкий², М.А. Шуленко²,
Е.Н. Люкманова^{1,2} З.О. Шенкарев^{1,2}*

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

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

Белки семейства Ly6/uPAR или трехпетельные белки (TFPs) являются эндогенными модуляторами никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR) человека и гомологичны α-нейротоксинам змей [1]. Основная структурная особенность этого класса белков заключается в наличии LU-домена с характерной «трехпетельной» структурой, содержащей β-структурное ядро,

стабилизированное дисульфидными связями, и три вытянутые петли. На сегодняшний день трехпетельные белки были найдены у многих животных, включая иглокожих, рыб, амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих. Несмотря на структурное сходство, эти белки отличаются большим функциональным разнообразием и играют различные роли в биологических процессах. Для белков семейства Ly6/uPAR человека показаны: способность регулировать никотиновые рецепторы в мозге и влиять на когнитивные процессы, способность контролировать гомеостаз тканей эпителия путем регуляции пролиферации и миграции кератиноцитов, а также участие в других регуляторных путях, таких, например, как Wnt/ β -catenin сигнальный каскад [2].

В данной работе была исследована структура и динамика белка человека SLURP-1, секретируемого клетками эпителия, и водорастворимых LU-доменов GPI-заякоренных трехпетельных белков Lynx2, Lypd6 и Lypd6b, представленных в мозге человека. Для исследования методами гетероядерной ЯМР-спектроскопии были получены рекомбинантные ^{15}N - и/или ^{13}C , ^{15}N -меченные аналоги этих TFPs. Белки нарабатывали в клетках *E. coli* в виде нерастворимых цитоплазматических тел включения, а затем солиubilизировали и проводили ренатурацию и очистку в условиях, индивидуально оптимизированных для каждого из белков. Пространственная структура белков была определена методом ЯМР-спектроскопии в растворе. Для получения стабильных образцов и ЯМР-спектров достаточного качества, для каждого из белков осуществляли подбор условий (pH и температура) накопления 2D и 3D спектров. Исследование проводили на спектрометрах AVANCE-III-600 и AVANCE-III-800 укомплектованных криодатчиками (Bruker). Для изучения внутримолекулярной динамики белков использовали данные о релаксации ядер ^{15}N . С использованием псевдо 3D экспериментов для большинства HN-групп основной цепи белков на частотах 60 и 80 МГц были измерены скорости продольной (R1) и поперечной (R2) релаксации, а также величины гетероядерного эффекта ^1H - ^{15}N -NOE. Анализ ^{15}N -релаксационных данных с помощью модель-независимого подхода позволил охарактеризовать общую вращательную диффузию TFPs в растворе, а также их внутримолекулярную динамику на двух временных диапазонах: пико-наносекунды и микро-миллисекунды. Кроме того, для белков SLURP 1, Lypd6 и Lypd6b наблюдались процессы конформационного обмена в диапазоне времен миллисекунды-секунды, связанные с *cis-trans* изомерией пептидных связей Xxx-Pro.

Результаты исследования белков SLURP-1, Lynx2, Lypd6 и Lypd6b были сопоставлены с опубликованными ранее данными по белкам Lynx1 [3] и SLURP-2 [4] человека, а также по α -нейротоксинам змей: WTX [5] и NTII [6]. В молекулах TFPs были выявлены две различные топологии вторичной структуры. Для Lypd6 и Lypd6b характерен один большой антипараллельный β -структурный лист, тогда как в остальных белках присутствуют по два β -листа. Кроме того, в петлях I и III белков Lynx2, Lypd6 и Lypd6b обнаружены α -спиральные участки. Различия в поверхностном распределении зарядов и гидрофобных групп указывают на значительные различия во взаимодействии трехпетельных белков с никотиновыми рецепторами. Множественное выравнивание пространственных структур TFPs и α -нейротоксинов в программе MAMMOTH-Mult, показало высокую степень сходства между большинством рассматриваемых белков, но, вместе с тем, позволило выделить молекулы Lynx2, Lypd6 и Lypd6b в отдельную группу. Согласно полученным данным, белки семейства Ly6/uPAR демонстрируют высокую конформационную пластичность: петли обладают подвижностью в пико-наносекундном диапазоне, тогда как для β -структурных фрагментов белков характерны движения в микро-миллисекундном диапазоне. SLURP-1 обладает наибольшей пластичностью и характеризуется неструктурированными петлями II и III, а также *cis-trans* изомеризацией связи Tyr39-Pro40, расположенной в центральной петле II. Вероятно, пластичность трехпетельных белков является их важной чертой, позволяющей адаптировать их структуру для оптимального взаимодействия с различными типами никотиновых рецепторов (например $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$ и т.д.) и с различными конформационными состояниями в рамках одного типа nAChR.

Работа поддержана РФФИ (№19-74-20176) и РФФИ (№20-04-00830, исследование Lypd6 и Lypd6b).

Литература

1. Loughner C. L., Bruford E. A., McAndrews M. S., Delp E. E., Swamynathan S., and Swamynathan S. K., "Organization, evolution and functions of the human and mouse Ly6/uPAR family genes," *Human genomics*, vol. 10. p. 10, 21-Apr-2016.

2. Vasilyeva, N.A.; Loktyushov, E.V.; Bychkov, M.L.; Shenkarev, Z.O.; Lyukmanova, E.N. Three-Finger Proteins from the Ly6/uPAR Family: Functional Diversity within One Structural Motif. *Biochemistry (Moscow)* 2017, 82, 1702–1715.
3. Lyukmanova, E.N. [et al.] NMR structure and action on nicotinic acetylcholine receptors of water-soluble domain of human LYNX1. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 10618–10627.
4. Lyukmanova, E.N. [et al.] Secreted Isoform of Human Lynx1 (SLURP-2): Spatial Structure and Pharmacology of Interactions with Different Types of Acetylcholine Receptors. *Sci. Rep.* 2016, 6, 30698.
5. Lyukmanova, E.N. [et al.] Structural Insight into Specificity of Interactions between Nonconventional Three-finger Weak Toxin from *Naja kaouthia* (WTX) and Muscarinic Acetylcholine Receptors. *J. Biol. Chem.* 2015, 290, 23616–23630.
6. Lesovoy, D.M.; Dubinnyi, M.A.; Nolde, S.B.; Bocharov, E.V.; Arseniev, A.S. Accurate measurement of dipole/dipole transverse cross-correlated relaxation [Formula: See text] in methylenes and primary amines of uniformly [Formula: See text]-labeled proteins. *J. Biomol. NMR* 2019, 73, 245–260.

УДК 577.323

Флуоресцентные свойства серебряных нанокластеров, стабилизированных цитозин-богатой нитью ДНК, комплементарной G-квадруплексу

Т.М. Фаткуллин¹, А.Д. Бениаминов^{1,2}, Д.Н. Калюжный^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

G-квадруплексы (G4-структуры) – пример неканонической структуры ДНК. Предположительно, G4-структуры играют важную роль в регуляции процессов репликации и транскрипции [1]. Однако проблема обнаружения G-квадруплексных структур в геномной ДНК живой клетки до сих пор остаётся актуальной. Одним из перспективных подходов к решению этой проблемы может оказаться применение ДНК-стабилизированных серебряных нанокластеров (DNA-AgNCs). Такие кластеры могут обладать высоким квантовым выходом флуоресценции, а также хорошей биосовместимостью и фотостабильностью [2]. Важной особенностью DNA-AgNCs является изменение их флуоресцентных свойств при взаимодействии с другими молекулами ДНК [3].

Целью данной работы было изучение флуоресцентных свойств нанокластеров, стабилизированных фрагментами ДНК, комплементарными к последовательностям, образующим G-квадруплексные структуры. Известно, что для формирования флуоресцирующих DNA-AgNCs важно наличие идущих подряд в одноцепочечной ДНК-матрице таких азотистых оснований, как цитозин и гуанин [4]. Именно такие последовательности могут возникать при образовании G-квадруплексов в геномной ДНК (в комплементарной к G4-структуре цепочке). Для исследования были выбраны два одноцепочечных олигонуклеотида:

- (C₃A)₄: d(CCCACCCACCCACCCA);
- (C₃A)₃: d(CCCACCCACCCA).

Первый из них комплементарен последовательности, образующей G4-структуру, второй – отдельному участку этой последовательности.

Серебряные нанокластеры формировали в водных растворах олигонуклеотидов путем добавления нитрата серебра с последующим восстановлением боргидридом натрия при комнатной температуре. Первичную оценку флуоресцентных свойств образцов проводили визуально с использованием трансиллюминатора с длиной волны возбуждения 254 нм. Для отдельных соотношений концентраций серебра и олигонуклеотидов наблюдалась заметная глазу флуоресценция. Оптические свойства наиболее ярких образцов исследовали детально.

Проведено сравнение спектров флуоресценции и возбуждения для двух олигонуклеотидов при различных соотношениях концентраций ДНК:AgNO₃:NaBH₄. Оказалось, что приготовленные на основе олигонуклеотида (C₃A)₄ нанокластеры имеют спектр флуоресценции с максимумом около 570 нм, а возбуждения – 480 нм. Кластеры, сформированные при разном отношении концентраций ионов серебра к ДНК, обладали сходными спектральными характеристиками, что свидетельствует об их схожей структуре. Однако, при некоторых концентрациях серебра отмечена красная компонента флуоресценции с максимумом около 710 нм при возбуждении 660 нм (рис. 1). Наличие двух пиков в спектре флуоресценции (C₃A)₄ может свидетельствовать о формировании двух типов DNA-AgNCs или о взаимодействии полученных кластеров между собой. Более короткий олигонуклеотид (C₃A)₃ стабилизировал кластеры с максимумом флуоресценцией около 630 нм при возбуждении

светом с длиной волны 570 нм. Проведена оценка времени жизни возбуждённого состояния при длине волны возбуждения 505 нм; для образцов с олигонуклеотидом $(C_3A)_4$ с отношением ДНК:AgNO₃:NaBH₄ равным 1:6:10 и 1:8:10 время жизни возбуждённого состояния $\tau \approx 4$ нс.

Таким образом, показано, что серебряные нанокластеры, сформированные на цитозин-богатой матрице ДНК, комплементарной нуклеотидной последовательности G4-структуры, обладают яркой флуоресценцией в видимой области спектра.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 20-04-00884).

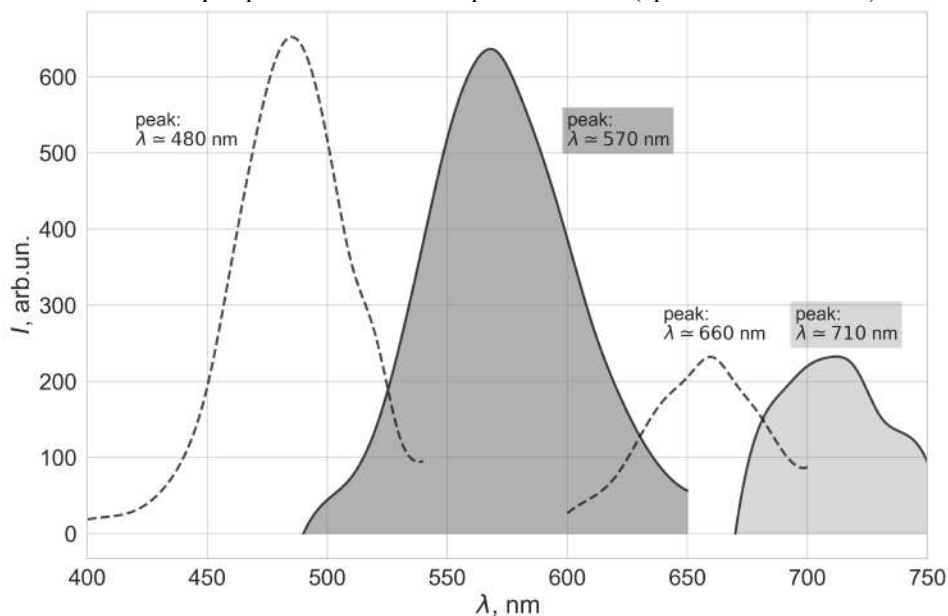


Рис. 1. Спектры возбуждения (пунктир) и флуоресценции (сплошная линия) для образца $(C_3A)_4$ с отношением концентраций ДНК:AgNO₃:NaBH₄ – 1:8:10

Литература

1. *Bochman M.L., Paeschke K., Zakian V.A.* DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. P. 770-780.
2. *Choi S., Yu J., Patel S.A., Tzeng Y.L., Dickson R.M.* Tailoring silver nanodots for intracellular staining // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011. V. 10. P. 109-115.
3. *Fang B., Li C., An J., Zhao S., Zhuang Z., Zhao Y., Zhang Y.* HIV-related DNA detection through switching on hybridized quenched fluorescent DNA-Ag nanoclusters // *Nanoscale.* 2018. V. 10. P. 5532-5538.
4. *Gwinn E.G., O'Neill P., Guerrero A.J., Bouwmeester D., Fygenson D. K.* Sequence-Dependent Fluorescence of DNA-Hosted Silver Nanoclusters // *Adv. Mater.* 2008. V. 20. P. 279-283.

УДК 577.344.3

Фотосенсибилизаторы I типа на основе фуллерена [60] и производных хлориновых и цианиновых красителей

**Е.А. Костина^{1,2}, А.Ю. Рыбкин², А.Ю. Белик², А.В. Козлов², К.Р. Тазиев³, Н.В. Филатова²,
Н.С. Горячев^{2,1}, А.И. Котельников^{2,1}**

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

²Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

³Сколковский институт науки и технологий

В настоящий момент активно развивается направление фотодинамической терапии (ФДТ) – эффективного неинвазивного метода лечения онкологических заболеваний. Основную роль в данном методе играет препарат-фотосенсибилизатор (ФС), который при возбуждении светом генерирует высокотоксичные активные формы кислорода. Комбинацией локального облучения опухоли и избирательного накопления ФС достигается высокая селективность действия ФДТ. Сейчас во всем мире ведется активный поиск более эффективных препаратов для ФДТ. Одним из способов создания высокоэффективных ФС является создание структур фуллерен(C₆₀)-краситель.

В представленной работе был исследован ряд синтезированных ранее диад фуллерен-метил-пиррофеофорбид (C_{60} -МПФФ) [1, 2], которые были растворены в воде с помощью создания наночастиц на основе амфифильных полимеров ПВП или ПЭГ. В ходе работы был проведен анализ размера данных наночастиц методом динамического рассеяния света, а также исследованы фотофизические свойства и фотодинамическая активность полученных структур. Фотодинамическая активность оценивалась как в модельных системах, согласно стандартным методикам по генерации супероксида (с использованием красителя нитросинего тетразолия) и по генерации синглетного кислорода (с использованием красителя 1,3-дифенилизобензофурана), так и на опухолевых клетках линий HeLa и MCF7.

Для всех диад C_{60} -МПФФ наблюдается значительное изменение спектра поглощения, сопровождающееся уширением пиков Sore и Q-полосы. Флуоресценция практически полностью потушена для всех диад C_{60} -МПФФ. Все исследуемые диады в составе наночастиц способны эффективно генерировать супероксид при облучении в области >630 нм. Эффективность генерации супероксида наночастицами диад в 2-10 раз превосходит активность исходного красителя МПФФ. В это же время для всех диад значительно падает эффективность генерации синглетного кислорода по сравнению со свободным красителем МПФФ. Добавление специфических тушителей синглетного кислорода (1,4-дiazобисциклооктана и азид натрия) не оказывает влияние на наблюдаемую картину. Полученный результат говорит о переключении механизма фотоактивности свободного красителя МПФФ с II типа (генерация синглетного кислорода) на I тип для диад (генерация супероксид анион-радикала).

Несмотря на то, что исследуемые диады практически не генерируют синглетный кислород, фотодинамическая активность ряда наночастиц на основе этих диад, показанная на опухолевых клетках линий HeLa и MCF7, оказалась сопоставима с такой для препаратов сравнения – исходного красителя МПФФ и тринатриевой соли хлорина e_6 , которые являются основой используемых в настоящий момент в клинической практике препаратов-фотосенсибилизаторов. Схожий результат ранее был показан также для других водорастворимых диад фуллерен-хлорин [3].

Таким образом, продемонстрированный механизм переключения фотоактивности и сопоставимая эффективность действия диад позволяет использовать для их создания более доступные красители с полосой поглощения в ближней ИК области, как, например, цианиновые красители (поглощение ~ 780 нм). Для данных красителей были получены диады с фуллереном и проведены первичные исследования их способности генерировать активные формы кислорода.

Исследования выполнены в рамках госзадания (номер госрегистрации А19-119112590105-7) и при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-00107).

Литература

1. Rybkin A. Yu. [et al.] Pyropheophorbide-Fullerene Dyad: Synthesis and Photochemical Properties // *Macroheterocycles*. 2019. V. 12. P. 181.
2. Kozlov A. V. [et al.] Synthesis by the Hummelen-Wudl Method and Physicochemical Study of Pyropheophorbide-Fullerene Dyad // *Macroheterocycles*. 2020. V. 13 P. 147.
3. Rybkin A. Yu. [et al.] Self-assembling nanostructures of water-soluble fullerene [60]–chlorin e_6 dyads: Synthesis, photophysical properties, and photodynamic activity // *Dyes and Pigments*. 2020. V. 180. P. 108411.

УДК 577

Эволюция тубулина: выявление молекулярной основы динамической неустойчивости бактериальных тубулинов

Л.О. Макарова¹

¹Московский физическо-технический институт (национальный исследовательский университет)

Белки α -тубулина и β -тубулина относятся к группе «домашнего хозяйства» эукариот. В цитоплазме клеток они формируют димеры, которые в свою очередь соединяются друг с другом и формируют микротрубочки (МТ), один из основных элементов цитоскелета клетки [1]. Ключевым свойством МТ является способность самопроизвольно переходить между событиями полимеризации и деполимеризации (динамическая неустойчивость) [2]. Считалось, что микротрубочки и образующие их димеры тубулинов характерны только для эукариотических клеток. Но гомологи α -и β -тубулина были идентифицированы в бактериях рода *Prostheobacter* [3]. Они были названы BtubA

и BtubB соответственно. Оба они обладают гомологией как к α -, так и к β -тубулину [4]. Электронная микроскопия показала, что BtubA/B образует микротрубочки *in vivo*, и эти микротрубочки содержат пять протофиламентов, в отличие от эукариотических микротрубочек, которые обычно содержат 13 [5]. Последующие исследования *in vitro* показали, что BtubA/B образует четырехпротофиламентные "мини-микротрубочки" (рис.1А), которые также обладают динамической нестабильностью [6].

Третичные структуры тубулинов бактерий и эукариот отличаются значительной гомологией (рис.1Б). Однако, сходство по аминокислотной последовательности между прокариотическим и эукариотическим тубулином составляет 35-37%. Данное исследование посвящено анализу сходства и различия первичной, вторичной и третичной структур бактериального и эукариотического тубулина для выявления ключевых элементов для формирования протофиламентов, микротрубочек и их динамической нестабильности.

Сравнение проводили для структур с PDB номерами 5o09 и 6DPU. Структурный анализ был выполнен в среде USCF Chimera. Последовательности для множественного выравнивания брали из GenBank базы NCBI, выравнивание выполняли с помощью алгоритма MUSCLE, филогенетическое дерево получали согласно матрице UPGMA.

В результате множественного выравнивания аминокислотных последовательностей тубулинов прокатит и эукариот и визуализацией консервативных областей на 3D структурах, в α -тубулинах была выявлена консервативная область Glu258, Leu 259, Thr261, Asn262, Leu263, Val264, Pro265 (для бактериального тубулина) и Glu254, Leu 255, Thr257, Asn258, Leu259, Val260, Pro265 (для эукариотического). Для β -тубулинов соответствующие области были следующего строения: Phe253, Val254, Asn256, Leu257, Val258, Pro259 в бактериальном и Leu255, Ala256, asn258, Met259, Val260, Pro261 в бактериальном. Анализ водородных связей (30° , 3,5Å) показал, что аминокислоты выявленного консервативного участка участвуют в образовании водородных связей между субъединицами тубулина. Это, позволяет предполагать, что выявленная структура является важной для образования лонгитудальных связей в протофилamente MT.

Было выявлено, что консервативная область располагается в разных местах относительно димера тубулина. Так, в MT эукариот она находится в междимерном пространстве, а в бактериях внутри димера.

Анализ водородных связей (30° , 3,5 Å) показал, что в эукариотическом тубулине между бетта и альфа субъединицами (то есть внутридимерная связь) образована большим количеством связей, чем в таком же сайте, но уже междимерном для бактериального.

Сравнение структур участков микротрубочек показало, что расстояние между субъединицами тубулина меньше в бактериальном протофилamente, чем в эукариотическом.

Таким образом, на основании сравнительного анализа кодирующих последовательностей белков тубулинов прокариот и эукариот и их структур была выявлена консервативная область, локализация и характеристика по возможным водородным связям которой указывает на ее значительную роль в образовании лонгитудальных связей в MT. Обнаружена инверсия в формировании димера: в эукариотических клетках димер формируется в виде β -тубулина в направлении растущего конца MT (+ конец) и сайта гидролиза ГТФ, α -тубулин расположен в направлении (-) конца. В бактериальных димерах наоборот: относительно сайта гидролиза ГТФ, А сверху, Б снизу. Выявлено, что междимерный сайт эукариотического тубулина является внутридимерным у бактериального. Как следствие, остается неизвестным направление роста, т.е. расположение (+) конца бактериальной микротрубочки, что важно для исследования динамической нестабильности. Выявленные закономерности в дальнейшем позволят провести направленный мутагенез бактериального тубулина для выявления роли обнаруженной консервативной области в формировании MT.

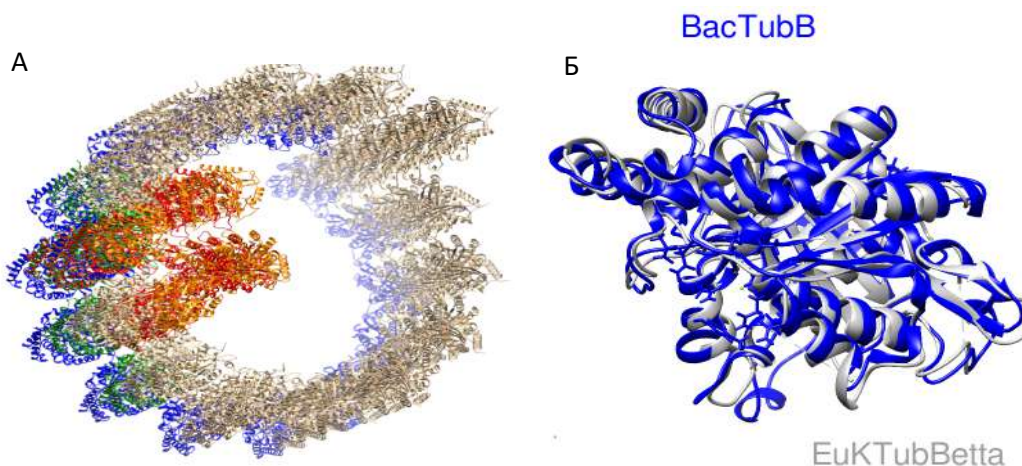


Рис.1. А) выравнивание 4х протофиламентной микротрубочки прокариот (PDB 5O09) относительно 14ти протофиламентной микротрубочке эукариот (6DPU). Б) Выравнивание структур субъединиц β -В тубулинов прокариот (синий) и эукариот (серый).

Литература

1. Gunning PW, Ghoshdastider U, Whitaker S, Popp D, Robinson RC. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J Cell Sci.* 2015 Jun 1;128(11):2009-19. doi: 10.1242/jcs.165563. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25788699.
2. Weisenberg RC. Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science.* 1972 Sep 22;177(4054):1104-5. doi: 10.1126/science.177.4054.1104. PMID: 4626639.
3. Jenkins C, Samudrala R, Anderson I, Hedlund BP, Petroni G, Michailova N, Pinel N, Overbeek R, Rosati G, Staley JT. Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 24;99(26):17049-54. doi: 10.1073/pnas.012516899. Epub 2002 Dec 16. PMID: 12486237; PMCID: PMC139267.
4. Martin-Galiano AJ, Oliva MA, Sanz L, Bhattacharyya A, Serna M, Yebenes H, Valpuesta JM, Andreu JM. Bacterial tubulin distinct loop sequences and primitive assembly properties support its origin from a eukaryotic tubulin ancestor. *J Biol Chem.* 2011 Jun 3;286(22):19789-803. doi: 10.1074/jbc.M111.230094. Epub 2011 Apr 4. PMID: 21467045; PMCID: PMC3103357.
5. Pilhofer M, Ladinsky MS, McDowall AW, Petroni G, Jensen GJ. Microtubules in bacteria: Ancient tubulins build a five- protofilament homolog of the eukaryotic cytoskeleton. *PLoS Biol.* 2011 Dec;9(12):e1001213. doi: 10.1371/journal.pbio.1001213. Epub 2011 Dec 6. PMID: 22162949; PMCID: PMC3232192
6. Deng X, Fink G, Bharat TAM, He S, Kureisaite-Ciziene D, Löwe J. Four-stranded mini microtubules formed by *Prostheco bacter* BtubAB show dynamic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jul 18;114(29):E5950-E5958. doi: 10.1073/pnas.1705062114. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28673988; PMCID: PMC5530688.

УДК 577

Электропроводящий гидрогель на основе PEDOT:PSS

А.О. Романов, Д.А. Кирилова, К.Г. Антипова, М.В. Вишневская, А.М. Азиева, П.М. Готовцев

НИЦ «Курчатовский институт»

Электропроводящий гидрогель – это трехмерная сеть перекрещивающихся полимерных цепей, обладающая комбинацией уникальных свойств. Одновременно с высокой проводимостью эти гибридные материалы обладают механическими свойствами полимерной системы, такими как гибкость и прочность. В данной работе представлен метод получения трёхкомпонентного гидрогеля из электропроводящего полимера PEDOT:PSS, полисахарида “йота-каррагинан” (CRG) и поливинилового спирта (PVA). PEDOT:PSS обладает высокой проводимостью и исключительной электрохимической стабильностью в окисленном состоянии [1]. CRG был выбран за его способности к набуханию и формированию геля. PVA позволяет придать механическую прочность и стабильность гидрогелю [2]. На рисунке 1 представлена: типичная кривая деформации образца. ВАХ ячейки с ферментами на поверхности электрода представлена на рисунке 2.

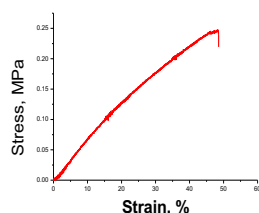


Рис. 1. Кривая деформации образца

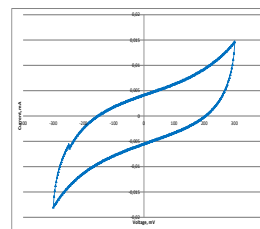


Рис. 2. ВАХ БТЭ с электродом из геля

Первые результаты применения электропроводящих гидрогелей в электродах биотопливных элементов и биосенсоров продемонстрировали хорошие электрохимические характеристики и большой (более 10 дней) срок работы. Так как выбранная система включает только биосовместимые полимеры, а метод получения не вносит дополнительных веществ, то полученный материал перспективен в качестве электродов для имплантируемых устройств.

Литература.

1. C. Yang, Z. Suo, Hydrogel ionotronics, Nat. Rev. Mater. 3 (2018)
2. J. Necas, L. Bartosikova, Veterinarni Med., 58, 2013 (4): 187–205

УДК 577.359

Электроспиннинг матриц с регулярным рельефом для изучения морфологии кератиноцитов линии HaCaT

А.С. Богданова^{1,2}, А.И. Соколова^{2,3}, Е.Р. Павлова^{1,2}, Д.В. Багров^{2,3}, Д.В. Клинов^{1,2}

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Электроспиннинг представляет собой технологию изготовления полимерных микро- и нановолокон. Под действием электростатических сил в процессе электроспиннга формируется струя раствора полимера, которая по мере испарения растворителя превращается в твёрдое волокно, а множество таких волокон образует нетканый наноматериал. Подобные материалы используются в качестве фильтров, катализаторов, элементов защитной одежды и в других приложениях [1].

Использование биосовместимых и биоразлагаемых полимеров, в том числе биополимеров, для изготовления нетканых материалов открывают возможности их биомедицинских приложений, например, для решения задач тканевой инженерии, локальной доставки и пролонгированного высвобождения лекарственных агентов (в частности – терапии опухолей, лечении раневых и ожоговых поверхностей) [2,3]. Различные коллекторные системы и методы постобработки нетканых материалов позволяют создавать матрицы с различной поверхностной структурой, плотностью и степенью ориентированности волокон. Состав и структура материала могут влиять на морфологию, дифференцировку и пролиферацию клеток, выращенных на данном материале [4].

В данной работе методом электроспиннинга были изготовлены матрицы с регулярным рельефом (patterned mats). Они состояли из смеси полилактида (ПЛА) и желатина (ПЛА: желатин = 1:1), в качестве растворителя использовали гексафторизопропанол. Для получения рельефа (упорядоченной укладки волокон) в качестве коллектора использовалась стальная сетка из прутьев толщиной 40 мкм с размером ячейки 50 мкм. Мы исследовали влияние поверхностной структуры матрикса на морфологию кератиноцитов человека линии HaCaT, в качестве контроля использовали матрицы без рельефа того же состава (ПЛА: желатин = 1:1 в ГФИП).

Матрицы с рельефом имели зоны более плотной упаковки волокон, соответствующие прутьям стальной сетки коллектора, и менее плотной – в ячейках сетки. Также матрицы с рельефом имели области радиальной ориентации волокон в узлах плетёной стальной сетки. На рис. 1 приведены изображения кератиноцитов HaCaT, выращенных на рельефных и контрольных матриксах, полученные методом СЭМ. Было обнаружено, что рельеф и участки из выравненных волокон не

оказывает существенного влияния на морфологию поверхности клеток (их шероховатость, количество отростков).

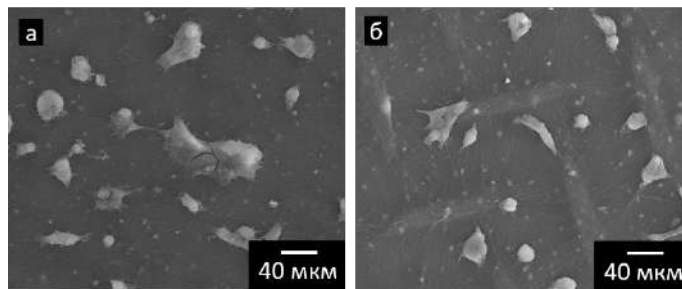


Рис. 1. Снимки СЭМ кератиноцитов HaCaT на матриксах из смеси ПЛА-желатин в ГФИП. (а) – контрольные, матриксы без рельефа; (б) – матриксы с рельефом.

С помощью конфокальной микроскопии были вычислены такие параметры, как площадь клеток и ядер, а также соотношение сторон (aspect ratio, AR) ядра. Средние значения параметров представлены в таблице 1. Мы получили, что площади клеток и ядер немного увеличиваются при переходе от матрикса без рельефа к матриксу с рельефом, а AR – уменьшается (по непараметрическому критерию Манна-Уитни различия с контролем статистически значимы, $p < 0,05$). Увеличение площади клеток может говорить об их лучшем распластывании на поверхности матриксов с рельефом.

Тип матрикса	Ядра		Клетки
	Площадь, мкм ²	AR	Площадь, мкм ²
Контроль (без рельефа)	93 ± 20	1,4 ± 0,2	165 ± 65
С рельефом	105 ± 27	1,3 ± 0,2	187 ± 77

Таб. 1. Средние значения площади клеток и ядер, AR ядер

Таким образом, мы обнаружили, что изготовленные нами матриксы с рельефом не оказывают существенного влияния на морфологию поверхности кератиноцитов, однако площадь клеток увеличивается при росте на матриксе с рельефом. В дальнейшем планируется изучение влияния рельефа полученных матриксов на пролиферацию кератиноцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №17-75-30064).

Литература

1. Wendorff J.H., Agarwal S., Greiner A. Electrospinning : Materials, Processing, and Applications. John Wiley & Sons, 2012. 481 p.
2. Buschle-Diller G., Hawkins A., Cooper J. Electrospun nanofibers from biopolymers and their biomedical applications // Modified Fibers with Medical and Specialty Applications. Springer Netherlands, 2006. P. 67–80.
3. Supaphol P. et al. Electrospinning of biocompatible polymers and their potentials in biomedical applications // Adv. Polym. Sci. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. V. 246, № 1. P. 213–240.
4. Denchai A., Tartarini D., Mele E. Cellular Response to Surface Morphology: Electrospinning and Computational Modeling. // Front. Bioeng. Biotechnol. Frontiers Media SA, 2018. V. 6. P. 155.

УДК 541.138

Электрохимические редокс-потенциалы нитроксильных производных биополимера хитозана по данным молекулярно-динамического моделирования и квантово-химических расчетов

В.Б. Крапивин¹, В.Б. Лужков^{1,2}

¹Институт проблем химической физики РАН

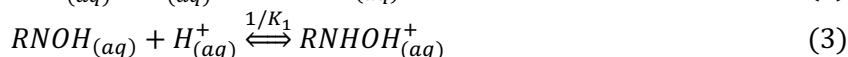
²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Хитозан представляет собой полисахарид, который получают гидролизом природного биополимера хитина. Хитозан обладает широким спектром биологической активности, включающим

антимикробную и антиоксидантную активность, регенерацию поврежденных тканей, усиление иммунитета, способность поглощать свободные радикалы, биосовместимость с клетками человека и биоразлагаемость. Также хитозан способен образовывать мицеллы в водном растворе, что может быть использовано для адресной доставки лекарств в противоопухолевой терапии. В связи с этим, хитозан и его производные обладают широкими перспективами прикладного использования. Наличие свободных аминогрупп открывает широкие возможности для химической модификации хитозана биологически активными соединениями. Перспективными объектами для такой модификации являются стабильные нитроксильные радикалы (нитроксилы) [1, 2]. Биологическая активность нитроксидов связана с ингибированием процессов перекисного окисления молекул в организме, в ходе которого нитроксильная группа оказывается вовлечена в циклический окислительно-восстановительный процесс. В связи с этим, важной характеристикой реакционной способности нитроксидов как отдельных молекул, так и в структуре олигомеров хитозана, являются редокс-потенциалы их окисления и восстановления.

В данной работе представлены расчеты редокс-потенциалов модифицированного короткого олигомера хитозана, состоящего из трех звеньев полисахарида и одого нитроксильного радикала, присоединенного к аминогруппе центрального звена. Использованы вычислительные методы квантовой химии и молекулярной динамики. Химические структуры исследуемых соединений представлены на рис. 1.

Предполагаемый механизм одноэлектронного восстановления нитроксильной группы в водном растворе определяется уравнениями (1) – (3)



Соответствующий редокс-потенциал восстановления нитроксиларассчитывается как

$$E_{red} = E_{red}^0 - \frac{RT}{F} \ln(K_1 K_2) + \frac{RT}{F} \ln(K_1 K_2 + K_1 [H^+] + [H^+]^2), \quad (4)$$

где $R = 8.314$ Дж/(моль·К) – универсальная газовая постоянная; $F = 96\,485.332$ Кл/моль – постоянная Фарадея; $T = 298.15$ К – температура; $[H^+] = 10^{-7}$ М – концентрация ионов водорода в нейтральном водном растворе.

Одноэлектронное окисление нитроксильной группе протекает по уравнению



Электрохимический потенциал связан с изменением свободной энергии в ходе химической реакции $E^0 = -\Delta G^0/F$. Свободная энергия всех изучаемых молекул была рассчитана методами квантовой химии и статистической термодинамики. Расчеты проводились по теории функционала плотности; оптимизация геометрии и расчет гармонических частот выполнялись с использованием функционала B3LYP в базисе 6-31+G(d,p), а расчет электронных энергий и свободных энергий сольватации – функционала M05-2X в базисе 6-311+G(2df,2p). Свободная энергия гидратации рассчитывалась в рамках континуумной модели растворителя SMD.

Основная цепь хитозана и нитроксильные заместители обладают высокой конформационной подвижностью. Для определения преобладающей структуры исследуемых соединений была изучена молекулярная динамика олигомеров хитозана и их нитроксильных производных в водном окружении (модель периодических ячеек) при $T = 300$ К. Расчеты выполнялись с использованием программы Namd 2 и параметров силового поля GLYCAM 06 для молекул **2**, **4** и TIP3P для H_2O . Моделирование показало, что возможны три конформации основной цепи хитозана, определяющие гибкость полисахарида, однако наиболее устойчивой является линейная ориентация, наблюдаемая в его кристаллической структуре. Наличие нитроксильного заместителя практически не влияет на конформационную подвижность хитозана при нейтральном pH. Пятичленный нитроксил **3** жестко соединен с хитозаном через систему двойных связей и не проявляет конформационных переходов, в то время как шестичленный нитроксил **1** оказался достаточно гибким. Молекулярная динамика и квантово-химические расчеты выявили 4 наиболее устойчивые конформации нитроксила **1**, связанные с возможностью вращения вокруг связей, соединяющих цикл нитроксила с основной цепью хитозана.

Квантово-химические расчеты выполнялись с использованием стартовых геометрий конформеров, полученных по данным молекулярной динамики. Свободные энергии усреднялись по

всем устойчивым конформациям, найденным для нитроксильных радикалов. Результаты расчетов представлены в таблице 1.

Таким образом, расчеты показали, что присоединение нитроксильного радикала к хитозану приводит к повышению редокс-потенциала окисления и понижению редокс-потенциала восстановления. Это связано с увеличением эффективного размера молекулы и как следствие меньшей стабилизацией заряженных частиц в водном растворе. Полученные данные расширяют ранее полученные результаты [2].

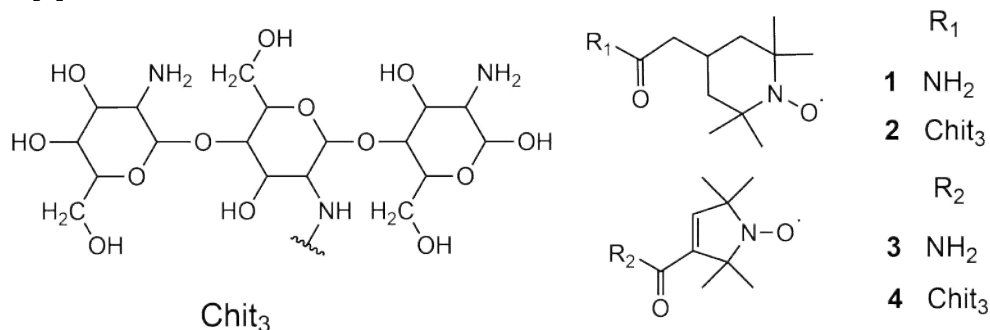


Рис. 1. Формулы моделируемых соединений

Соединение	E_{ox}^0	E_{red}^0	E_{red}
1	830	-1432	-215
2	899	-1353	-232
3	976	-1339	-290
4	1066	-1384	-328

Таб. 1. Вычисленные редокс-потенциалы (мВ) соединений **1-4** в водном растворе при pH=7, приведенные относительно стандартного водородного электрода (СВЭ). Абсолютный потенциал СВЭ принят равным 4.44 В.

Литература

1. Sen' V.D., Sokolova E.M., Neshev N.I., Kulikov A.V., Pliss E.M. Low molecular chitosan–(poly)nitroxides: Synthesis and evaluation as antioxidants on free radical-induced erythrocyte hemolysis // *Reactive Funct. Polym.* 2017. V. 111. P. 53-59.
2. Krapivin V.B., Sen' V.D., Luzhkov V.B. Quantum chemical calculations of the one-electron oxidation potential of nitroxide spin labels in biologically active compounds // *Chem. Phys.* 2019. V. 522. P. 214-219.

УДК 577.112.083

Флуоресцентное мечение как способ модуляции селективности лигандов Kv каналов на примере агитоксина 2

А.Л. Примак^{1,2}, О.В. Некрасова², А.В. Феофанов^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. Ломоносова»

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

Недавно разработанные химеры флуоресцентный белок-токсин показали активность по блокированию потенциал-зависимых калиевых каналов семейства Kv1 и сохранили почти полностью фармакологические профили нативных пептидных токсинов [1]. Данные свидетельствуют о том, что генетически кодируемые блокаторы флуоресцентных пептидов представляют собой новые инструменты для фармакологических исследований каналов Kv1.

В нашей работе сконструированы и выделены химерные GFP-меченые AgTx2, отличающиеся расположением флуоресцентной метки (на N или C конце), а также линкером. Проведено исследование специфичности этих конструкций с сайтом связывания эукариотического Kv1 с использованием модельной системы на основе клеток E.coli, экспрессирующих гибридные калиевые каналы

KcsA-Kv во внутренней мембране. Обнаружено, что химерные конструкции AgTx2 с GFP, расположенном на N-конце, взаимодействуют только с лиганд-связывающим сайтом канала Kv1.3 и не образуют комплексов с сайтами связывания каналов Kv1.1 и Kv1.6. Измерены соответствующие константы диссоциации комплексов.

Исследования связывающей активности GFP-AgTx2 и его модифицированных аналогов показали, что в основе этой селективности лежит N-концевое расположение GFP, поскольку перенос GFP на C-конец AgTx2 восстанавливает специфические взаимодействия с Kv1.1 и Kv1.6 сайтами связывания.

Эксперименты по конкурентному связыванию показали, что сайт связывания GFP-L2-AgTx2 перекрывается с сайтами связывания известных блокаторов пор Kv1.3-каналов - ChTx, KTX 1 и AgTx 2. Продемонстрировано, что GFP-AgTx2 применим в качестве флуоресцентного зонда для поиска блокаторов пор Kv1.3 среди отдельных соединений и в сложных смесях, для измерения сродства к блокаторам.

Показано, что различия в положении флуоресцентной метки и строении линкера (на примере GFP-AgTx2 и AgTx2-GFP) могут изменять чувствительность лиганда к изменению концентрации солей раствора (измерены соответствующие константы диссоциации комплексов с KcsA-Kv1.3).

На примере HEK293 показана возможность использования GFP-AgTx2 для визуализации распределения Kv1.3 на плазматической мембране Kv1.3-экспрессирующих эукариотических клеток.

Kv1.3 участвует в патогенезе различных заболеваний (в основном аутоиммунного происхождения) [2], что обуславливает особую значимость получения высокоселективного лиганда этого канала.

В более широком смысле, наши исследования показывают, что определенные комбинации флуоресцентных белков и пептидных блокаторов могут приводить к значительной модуляции профиля связывания естественного блокатора с каналом, приводя к селективным флуоресцентным лигандам определенных каналов.

Литература

1. Kuzmenkov A.I., Nekrasova O.V., Kudryashova K.S., Peigneur S., Tytgat J., Stepanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V., Feofanov A.V., and Vassilevski A.A. Fluorescent protein-scorpion toxin chimera is a convenient molecular tool for studies of potassium channels // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 33314.
2. Zhao W., and Chen Y. Progress in Research of KV1.1 and KV1.3 Channels as Therapeutic Targets // *Curr. Top. Med. Chem.* 2016. V. 16. Pp. 1877–1885.

Научное издание

Труды

63-й Всероссийской научной конференции МФТИ

23–29 ноября 2020

Биологическая и медицинская физика

Составители:
Д.А. Диких, Е.Е. Куликов

Редактор:
В.А. Дружинина

Набор и вёрстка:
Д.А. Колпаков

Подписано в печать 20.11.2020. Формат $60 \times 84 \frac{1}{8}$. Усл. печ. л. 17,5. Тираж 70 экз. Заказ №44.
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»
141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

Отпечатано в полном соответствии с предоставленным оригиналом-макетом
Типография «М-Принт»
105082, г. Москва, ул. Ф.Энгельса, д.75, стр.21



**Контактная информация
оргкомитета конференции:**

117303, г. Москва, ул. Керченская, д. 1А, корп. 1
+7 498 744-65-52
conf@mipt.ru

**Официальный сайт
конференции**
conf.mipt.ru

ISBN 978-5-7417-0758-6



9 785741 707586 >