
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
РОССИЙСКОЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО ИМЕНИ И.П. ПАВЛОВА
РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ
РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ФОНД
при участии
СОЮЗА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЩЕСТВ СТРАН СНГ



III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

VII СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ
♦
НАУЧНАЯ СЕССИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА
ИМЕНИ И.П. ПАВЛОВА

♦
VII СЪЕЗД БИОХИМИКОВ РОССИИ
♦
X РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»
♦

НАУЧНЫЕ ТРУДЫ ТОМ 3

Под редакцией
А.Г. Габибова, М.А. Островского, Р.И. Сепиашвили

Сочи – Дагомыс, Россия
3–8 октября 2022

УДК 57
ББК 28я43
Т66

*Под редакцией
А.Г. Габимова, М.А. Островского,
Р.И. Сениашивили*

**III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ,
БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ**

◆ VII СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ

◆ VII СЪЕЗД БИОХИМИКОВ РОССИИ

◆ X РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»

(Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2022).

НАУЧНЫЕ ТРУДЫ. Том 3. – М.: Издательство «Перо», 2022. – с.129

ISBN 978-5-00189-677-7 (Общ.)

ISBN 978-5-00204-790-1 (Т.3.)

Сборник научных трудов включает материалы симпозиальных докладов, выступлений на заседаниях круглых столов и стендовых докладов, представленных на VII Съезде физиологов СНГ, VII Съезде биохимиков России и X Российском симпозиуме «Белки и пептиды» в рамках III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. Тематика представленных докладов охватывает актуальные разделы физиологии, биоорганической химии, биотехнологии, молекулярной биологии, молекулярной вирусологии и смежных дисциплин.

Книга рассчитана не только на специалистов, работающих в разных областях биомедицинских наук, но и на студентов, аспирантов, преподавателей и научных работников, интересующихся проблемами наук о жизни.

ISBN 78-5-00204-790-1 (Т.3.)

УДК 57

ББК 28я43

© Российское общество биохимиков и молекулярных биологов, 2022

© Союз физиологических обществ стран СНГ, 2022

© Коллектив авторов, 2022

Содержание

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Белки и пептиды	4
Химия и биология нуклеиновых кислот	22
Геном. Протеом. Метаболом	27
Системная биология	35
Биотехнология: фундаментальные основы и приложения	40
Биохимия растений	46
Гликобиология	48
Молекулярная вирусология	57
Биохимия и молекулярная медицина	61
Молекулярный имиджинг	74
Нейродегенеративные заболевания: от изучения клеточных и молекулярных механизмов патогенеза до разработки инновационных методов диагностики и лечения	79
Нейрофизиология. Молекулярная нейрофизиология	82
Молекулярная физиология клетки. Рецепторы, ионные каналы и сигнальные системы	89
Физиология иммунной системы	92
Физиология процессов морфогенеза и репарации	93
Физиологические аспекты опухолевого роста	95
Адаптация, стресс и здоровье	98
Физиология двигательной деятельности. Космическая физиология	100
Физиология сердца	108
Физиология высшей нервной деятельности и психофизиология	113
Физико-химические методы исследования бионаносистем для медицины	117
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	124

X РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ЭКЗОГЕННЫХ ПЕПТИДОВ В ПЛАЗМЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА. ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ И ОРГАНИЗМОМ ЧЕЛОВЕКА

Г.П. Арапиди^{1,2,3}, А.С. Урбан^{1,2}, В.О. Шендер^{1,2}, И.О. Бутенко¹, О.Н. Букато¹, А.А. Кузнецов¹, О.М. Иванова¹, Л.В. Лопухов⁴, А.В. Лайков⁴, Н.И. Шарова⁵, М.Ф. Никонова⁵, А.Н. Митин⁵, А.И. Мартынов⁵, Т.В. Григорьева⁴, Е.Н. Ильина¹, В.Т. Иванов², В.М. Говорун¹

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва; ⁴Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ⁵ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва

Симбиоз между организмом человека и его микробиотой - важный вопрос современной биомедицины и персонализированной медицины, однако о молекулярных механизмах этой связи известно немного. Принимая во внимание повсеместное участие пептидов в биомолекулярных взаимодействиях и регуляторных процессах, мы предприняли попытку прямого поиска пептидов кровотока человека, происходящих из белков микроорганизмов. LC-MS/MS анализ образцов сыворотки и плазмы крови 20 здоровых доноров провели на масс-спектрометре Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap. Подготовку образцов провели на основе разработанного нами метода десорбции пептидов с поверхности основных белков плазмы крови. Для идентификации пептидов последовательности белков человека были взяты из базы знаний UniProt Knowledgebase, а последовательности белков микробиоты человека - из проекта NIH Human Microbiome Project.

В результате из 13625 идентифицированных пептидов 912 это уникальные фрагменты белков микробиоты человека, что составляет около 6,69% от общего количества обнаруженных пептидов кровотока. В 30 случаях идентификацию пептидов микробиоты в кровотоке подтвердили масс-спектрометрическим анализом индивидуальных синтетических пептидов. Абсолютная количественная оценка с помощью масс-спектрометрического метода мониторинга множественных реакций подтвердила присутствие бактериальных пептидов в кровотоке человека в диапазоне приблизительно от 0,1 нМоль/л до 1 мкМоль/л, что сопоставимо с физиологически значимыми концентрациями гормонов в крови человека в норме. Представленность пептидов микробиоты достигает максимум примерно через 5 ч после приема пищи. Большинство пептидов коррелируют с бактериальным составом тонкой кишки и, вероятно, получены путем гидролиза мембранных белков трипсином, химотрипсином и пепсином - основными протеазами желудочно-кишечного тракта. Пептиды обладают физико-химическими свойствами, позволяющими им избирательно преодолевать барьер слизистой оболочки кишечника и противостоять фибринолизу. Предлагаемый подход к идентификации пептидов микробиоты в крови может быть полезен для определения состава микробиоты труднодоступных участков кишечника и контроля проницаемости слизистого барьера кишечника. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (20-15-00400).*

ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ОТПЕЧАТКА ШТАММОВ *BACILLUS PUMILUS*, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ.

М.Н. Баранова^{1,2}, С.С. Терехов^{1,2}, А.М. Куджаев^{1,2}, Ю.А. Мокрушина^{1,2}, И.В. Смирнов^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва

Изучение механизмов устойчивости и поиск антибиотиков имеют решающее значение для опережения распространения резистентных бактерий. Симбиотическая микрофлора диких животных может быть рассмотрена как богатый источник штаммов, проявляющих антагонистические свойства в отношении патогенов. В результате профилирования разнообразных образцов таких сообществ с помощью платформы сверхвысокопроизводительного скрининга были неоднократно идентифицированы штаммы *Bacillus pumilus*, эффективно подавлявшие рост *S. aureus*. Для отобранных штаммов были проведены полногеномное секвенирование и последующий поиск биосинтетических кластеров с использованием пакета antiSMASH. Несмотря на различие фенотипов, для всех продуцентов с антибиотическими свойствами был обнаружен общий набор характерных кластеров, кодирующих белки, ответственные за продукцию антибиотика амикумаина (Ami), сидерофора бациллибактина и предполагаемых аналогов противомикробных веществ, включающих бацилизин, циклический бактериоцин класса Pd, сурфактин и десферриоксамин. Как единственный вторичный метаболит, обеспечивающий антибактериальный эффект, был идентифицирован амикумаин. По генам, кодирующим ключевые ферменты биосинтеза Ami, в результате биоинформатического анализа выделено три семейства кластеров у представителей рода *Bacilli*, характерные для *B. pumilus*, *B. subtilis* и *Paenibacillus*. В геномах *B. cereus* и *B. thuringiensis* обнаруживаются родственные кластеры, кодирующие биосинтез цвиттермицина; анализ гена ключевого гибридного фермента PKS/NRPS AmiI или его гомолога ZmaK позволяет отличать эти биосинтетические кластеры от кластеров биосинтеза Ami. Для представителей *Bacillus* и *Paenibacillus* характерны различные ферменты, обеспечивающие ауторезистентность и активацию антибиотика при секреции: в то время как у *Bacillus* эту функцию выполняют киназа AmiN и фосфатаза AmiO, мы предполагаем, что ауторезистентность *Paenibacillus* обеспечивается метил- или ацетилтрансферазами. Пробиотическая активность выделенных штаммов в совокупности с межвидовым разнообразием кластеров Ami предполагает высокое влияние штаммов-продуцентов Ami на бактериальные сообщества. Глубокая характеристика генотипа и метаболического профиля открывает новые возможности для инженерии пробиотических штаммов. *Работа поддержана грантом РНФ № 19-14-00331.*

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИИ ЛИЗОСОМ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ

А. Пароди¹, В.С. Егорова¹, Е.П. Колесова¹, А.О. Сырочева¹, М.В. Воронина¹, А.С. Фролова^{1,2}, А.А. Замятнин^{1,2,3,4}

¹Университет Сириус, Сочи; ²Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

³Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва; ⁴Университет Суррея, Гилфорд, Великобритания

Nanomedicine gained increasing attention in the last decades for its fundamental role in improving targeted drug delivery, in particular for cancer disease. In this scenario, it is important to highlight that the final destination of the nanoparticle is usually the lysosomal compartment, while the therapeutic payload usually is supposed to target organelles and proteins of the cell cytoplasm. Some kinds of payloads (i.e. biologics) require to be delivered directly in the cell cytoplasm to function effectively as therapeutics and avoid lysosomal degradation. Others can diffuse in the cell's body from the lysosomal lumen. Here, we present different nanocarriers to optimize the delivery of biologics and small molecules and we will discuss the cellular impact that lysosomal escape and carrier degradation have on cancer cell biology. In particular, pH responsive hybrid polymeric/silica nanoparticles will be used to investigate the process of lysosomal escape. We will show effective delivery of mRNA in cancer cells and the cellular effects of the stress caused by lysosomal escape, eventually resulting in the re-compartmentalization of the particles in multilaminar bodies as the result of an autophagocytic process. On the other hand, particle degradation in the lysosomal compartment will be investigated through albumin nanoparticles. In this case we generated low and high sensitive carriers to the protease activity and we demonstrated the effects that particle stability has on the carriers' drug delivery properties as well as on lysosomal expression of cathepsins.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ CAS9 С ДВУЦЕПОЧНЫМИ ДНК В КОМПЛЕКСЕ CAS9/sgRNA

С.В. Баранова¹, А.А. Черносов¹, В.В. Коваль^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины; ²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск

В основе многих процессов живых организмов лежит взаимодействие белков с нуклеиновыми кислотами. Эндонуклеаза Cas9 способна вносить двуцепочечный разрыв в молекулу ДНК, управляется она при помощи РНК-гидов. Часть последовательности РНК обеспечивает узнавание и связывание с белком, а другая образует дуплекс с комплементарной ДНК и определяет последовательность с которой свяжется белок. Двуцепочечный разрыв вносится в месте, где за комплементарным участком находится NGG-мотив, который называется РАМ. Разрыв происходит на расстоянии три-четыре нуклеотида от этой последовательности. Данная работа заключалась в анализе закономерностей взаимодействия белка Cas9 с ДНК. Для этого изучалось влияние положения некомплементарной пары оснований в ГАМ-меченных олигонуклеотидах, соответствующих последовательности ДНК субстрата, в которой происходит связывание направляющей РНК с ДНК мишенью, на эффективность работы фермента. Замена некоторых нуклеотидов в положениях около последовательности РАМ приводят к снижению скорости реакции расщепления олигонуклеотидов эндонуклеазой Cas9. Показано что ферментативная активность Cas9 может проявляться с не полностью комплементарным ДНК-субстратом. Полученные данные свидетельствуют о высокой специфичности белка Cas9 системы CRISPR/Cas к ДНК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 20-14-00214.

ГИБРИДНЫЙ ОЛИГОМЕРНЫЙ БЕЛОК ADGroEL-SacSM: СОЗДАНИЕ, ПОЛУЧЕНИЕ, ОСОБЕННОСТИ СВОРАЧИВАНИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ

Н.В. Леконцева, А.Е. Своєглазова, А.О. Михайлина, В.В. Марченков, В.А. Балобанов

Институт белка РАН, Пушино

Создание гибридных белков путём комбинации природных доменов – давно используемый приём белковой инженерии. Наши исследования направлены на применение этого приёма для олигомерных белков. Необходимо определить возможные преимущества и ограничения при создании белков путём комбинации олигомеров. В данной работе мы создаём и проверяем инструмент для стабилизации кольцевых гомеолигомерных белков. Присоединение субъединиц целевого белка к основе, которая их сближает и удерживает в правильной взаимной ориентации должно стабилизировать этот олигомер. В качестве основы нами выбран кольцевой гомогептамерный Sm-подобный белок из *Sulfolobus acidocaldarius* (SacSm). Для проверки наших предположений мы присоединили к нему апикальный домен белка шаперона GroEL (ADGroEL). Сам по себе этот домен, будучи отделённым от остальной молекулы, не образует олигомерное кольцо. В нашей конструкции гиперстабильный SacSm удерживает семь ADGroEL вместе и, как мы предполагаем, принуждает их к олигомеризации. После проведённого анализа структур этих белков мы спроектировали соединяющий их линкер. Этим линкером белки были объединены в единую полипептидную цепь. Спроектированный гибридный белок был получен и исследован различными физико-химическими методами. Была показана ступенчатая сборка и самоорганизация этого белка. В первую очередь собирается основа SacSm, а затем на ней сворачиваются ADGroEL. Исследования показали, что готовый белок обладает термостабильностью выше, чем отдельный ADGroEL и даже выше чем полноразмерный GroEL, а высокая стабильность вновь создаваемых белков – одна из важнейших целей белковой инженерии. При этом полученный гибридный белок способен связывать ненативные белки, связываемые полноразмерным шапероном GroEL. Также он снижает агрегацию ряда белков при их нагревании, что подтверждает его шаперонную активность. Таким образом, выбранный нами путь инженерии позволил создать эффективный термостабильный шаперон. Полученный результат показывает продуктивность создаваемого нами инструмента для стабилизации олигомерных белков. Этот инструмент может быть использован для ряда молекулярно-биологических задач требующих стабилизации кольцевых олигомерных белков.

Работа поддержана грантом РНФ 22-24-00934.

МЕХАНИЗМЫ САМООРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВЫХ КАПСИДОВ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРУСОВ

З.Г. Дениева¹, М.М. Попова¹, М.А. Калущий¹, Е.С. Булавко¹, А.С. Лощкарева¹, Е.В. Штыкова², О.В. Батищев¹

¹Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН; ²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова, ФИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва

Оболочечные вирусы, к которым относятся такие патогены, как SARS-CoV-2, вирус гриппа, вирус иммунодефицита человека и многие другие, представляют собой семейство возбудителей тяжелых заболеваний. Все эти вирусы имеют липопротеиновую оболочку, содержащую структурные белки, необходимые для сборки вирионов, их слияния с клеточной мембраной-мишенью, а также для выхода вновь сформированных вирусных частиц из инфицированной клетки. Во всех оболочечных вирусах структурным белком с наибольшим числом копий являются их капсидные или матриксные белки, которые одновременно являются одними из наиболее консервативных белков среди различных штаммов любого вируса. Однако ни один из этих белков пока не является мишенью для противовирусных препаратов. Мы использовали различные биофизические и структурные методы, чтобы продемонстрировать, что капсидные или матриксные белки многих оболочечных вирусов используют общие физико-химические механизмы для регуляции сборки вирусного каркаса и организации выхода дочерних вирионов из инфицированной клетки. Эти механизмы включают различные варианты мембранной активности структурных белков вирусов, включая поверхностную активность, электростатические взаимодействия, влияние на структуру липидных и липид-белковых доменов, а также встраивание в липидную мембрану. Таким образом, несмотря на различия в структуре капсидных и матриксных белков различных вирусов, их функциональная активность может быть представлена как совокупность ограниченного набора физико-химических механизмов, и эта функциональная активность является общей для всех оболочечных вирусов. Таким образом, наши результаты открывают новый путь для поиска возможных противовирусных препаратов, нацеленных на самоорганизацию вирусных белков и липид-белковые взаимодействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-13-00435).

НОВЫЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ФЕРМЕНТ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СВОЙСТВА

А.В. Бачева¹, М.Н. Баранова^{1,2}, С.О. Пипия^{1,2}, Д.А. Кузнецов^{1,3}, А.М. Куджаев^{1,2}, Ю.А. Мокрушина^{1,2}, С.С. Терехов^{1,2}, И.В. Смирнов^{1,2}

¹Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва; ²ИБХ РАН, Москва; ³РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Проблема стремительного распространения устойчивости к антибиотикам среди патогенных бактерий — одна из самых острых проблем современной медицины, поэтому разработка новых антимикробных препаратов является очень важной задачей на настоящий момент. Новые антибиотические препараты обычно представляют собой уже известные вещества, в которые внесены химические модификации, и зачастую трудности в лечении этими препаратами возникают из-за быстрого развития к ним резистентности. Развитие устойчивости к антибиотикам является серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире. Ферменты, относящиеся к классу гидролаз, и обладающие способностью разрушать стенки патогенных бактерий, являются перспективными антибактериальными препаратами. При помощи платформы ультравысокопроизводительного скрининга из микробиома ротовой полости енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides*) был отобран штамм E18, проявлявший антагонистические свойства в отношении *Staphylococcus aureus*. Этот штамм-продуцент был идентифицирован как *Staphylococcus pseudintermedius*, для секретируемого активного метаболита проведены подбор и оптимизация условий наработки. Путём хроматографической очистки активного соединения и масс-спектрометрического анализа полученной фракции установлено, что антистафилококковое действие штамма обеспечивается секретиремым ферментом массой 27 кДа, названным нами ритафином. Путём полногеномного секвенирования был установлен ген, кодирующий этот белок. С помощью биоинформатических методов показано, что фермент принадлежит семейству M23 цинковых металлопротеаз и является гомологом фермента лизоцистина (степень гомологии 63,1%), который представляет собой секретиремую глицил-глициновую эндопептидазу, лизирующую клеточные стенки стафилококков посредством гидролиза пентаглициновых поперечных сшивок пептидогликана. Определены некоторые физико-химические характеристики и ферментативные свойства ритафина. *Работа поддержана грантом РФФ № 19-14-00331-П.*

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ВОЗМОЖНО ОТСЛЕЖИВАТЬ С ПОМОЩЬЮ КРАСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ХРОМОФОРА GFP

А.С. Белоусов¹, И.В. Маслов¹, П.А. Хорн¹, М.С. Баранов², А.С. Мишин², А.В. Мишин¹, Е.Ю. Зерный³, С.Е. Пермяков⁴, В.И. Борщевский¹

¹Московский физико-технический институт, Москва; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ³МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва; ⁴Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пушкино

Рековерин представляет собой белок с массой 23 кДа, относящийся к суперсемейству EF-hand Ca²⁺-связывающих белков. Одной из функций рековерина является регулирование активности родопсина GPR1, регулирующей активность родопсина. При тусклом окружающем освещении уровень кальция в палочковидных клетках сетчатки высок, поэтому рековерин связывается с кальцием, высвобождает миристоиловую группу, прикрепляется к липидному бислою и ингибирует родопсин-киназу. Таким образом, рековерин сохраняет чувствительность родопсина к фотонам, и позволяет глазу обнаруживать визуальные сигналы даже в условиях низкой освещенности. Высвобождение миристоилового группы при активации значительно изменяет конформацию белка, что позволяет проводить эксперименты с отслеживанием конформации рековерина. Многие биофизические методы ранее использовались для изучения конформационной динамики рековерина, включая ЯМР, поверхностный плазмонный резонанс и флуоресцентную спектроскопию. В данной работе мы описываем флуоресцентные сольватохромные красители, пригодные для спектроскопического наблюдения конформационных изменений в рековерине. Мы изучили четыре красителя на основе хромофорного ядра GFP, которые присоединяются к единственному дис-

теину в 39-м положении с помощью малеимид-тиолового взаимодействия. Мы подтвердили связывание красителя с реверинном, проверили специфичность покраски, а затем два из четырех образцов показали изменения в фотофизических свойствах (спектры эмиссии и возбуждения флуоресценции) при добавлении CaCl_2 к неактивному и EGTA к активному белку. Один из четырех красителей был успешно использован для отслеживания конформационных изменений GPCR, индуцированных различными лигандами. Наши эксперименты подтвердили сольватохромные свойства исследованных флуоресцентных красителей и показали, что они могут быть успешно использованы для спектроскопического наблюдения конформационной динамики в белках. *Работа поддержана Министерством науки в высшего образования РФ (соглашение # 075-00337-20-03, проект FSMG-2020-0003).*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРА ПРИ ПСИХИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

И.С. Бокша, О.К. Савушкина, Е.Б. Терешкина, Е.А. Воробьева, Т.А. Прохорова, Г.Ш. Бурбаева

Научный центр психического здоровья, Москва

Более 20 лет назад мы охарактеризовали три формы ГДГ мозга человека (GDH I-III), наличие которых может объясняться альтернативным сплайсингом: существованием по меньшей мере 3 транскриптов гена *GLUD1*, тогда как продукт транскрипции *GLUD2* - гена без интронов - один. Разнообразие белковых форм ГДГ мозга человека может быть связано с обеспечением нейропластичности, поскольку ГДГ – ключевой фермент метаболизма нейромедиатора глутамата, а в свете существования полифункциональных “moonlighting” ферментов, с «побочной» активностью ГДГ, локализованной вне митохондрий (в ядре). Данные о внутриклеточной локализации белковых форм ГДГ (*GDH1* и *GDH2* - продуктов генов *GLUD1* и *GLUD2*) получены при изучении мозга животных. Считается, что они адресуются в основном в матрикс митохондрий, и транспорт их туда осуществляется благодаря сигнальным пептидам. *GDH1* и *GDH2* различаются последовательностями сигнальных пептидов (гидрофобностью и силой ассоциации с мембранами). Ранние работы указали на роль ГДГ при нейродегенеративных заболеваниях, но исследования форм ГДГ мозга человека редки вследствие труднодоступности материала. Наши исследования показали количественные изменения ГДГ в мозге пациентов при психических патологиях. Обнаружение форм ГДГ в тромбоцитах человека открыло возможность применения тромбоцитарной ГДГ в качестве биомаркера, связанного с клиническими проявлениями психической патологии. При шизофрении в тромбоцитах уменьшается количество ГДГ, состоящей из 56-кДа субъединиц, но не 58-кДа формы. В будущем предполагается изучить, нарушены ли при психической патологии процессы транспорта тромбоцитарной ГДГ в митохондрии или регистрируемые изменения связаны с общим снижением синтеза белка ГДГ. В тромбоцитах нет ядра, и наличие ассоциированной с ядром ГДГ в них маловероятно. Мы не обнаружили в тромбоцитах ГДГ, ассоциированной с мембранной фракцией, с использованием антител, специфичных к мембранной форме (*GDH III*) мозга человека, и *GDH III* может быть формой, локализованной в ядрах клеток мозга. Прогресс в исследовании ГДГ и использование разнообразных антител, полученных к рекомбинантным ГДГ человека для специфического обнаружения различных форм ГДГ позволят понять, с чем связаны наблюдаемые при психической патологии изменения активности тромбоцитарной ГДГ.

ДИНАМИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ D-ЭНАНТИОМЕРНОГО ПЕПТИДА, РАЗРАБОТАННОГО ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА, С МЕМБРАНОСВЯЗАННЫМ ПРЕДШЕСТВЕННИКОМ β -АМИЛОИДА

И.С. Охрименко¹, П.Е. Волынский², Я.В. Бершацкий^{1,2}, Ю.А. Загрядская¹, А.В. Камынина^{1,2}, П.К. Кузьмичев², К.В. Павлов³, А.С. Арсеньев^{1,2}, Р.Г. Ефремов^{1,2}, Э.В. Бочаров^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; ³ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Болезнь Альцгеймера — разрушительное нейродегенеративное заболевание, приводящее к тяжелой деменции. Детальная информация о структуре, динамике и различных межмолекулярных взаимодействиях биомолекул, непосредственно участвующих в развитии болезни Альцгеймера, необходима для рациональной разработки новых биологически активных соединений и скрининга существующих с целью получения наиболее эффективных кандидатов в лекарственные средства. D-энантиомерный пептид D3 и его производные недавно были отобраны с помощью фагового дисплея для прямого разрушения агрегатов нейротоксического амилоидного пептида- β ($\text{A}\beta$), являющегося продуктом последовательного расщепления белка-предшественника амилоида (APP). В настоящее время одно из D3-подобных соединений проходит фазу II клинических испытаний, однако молекулярные детали его профилактического или фармакологического действия с высоким разрешением не совсем ясны. Для решения проблемы мы использовали комплексный подход, основанный на биохимических и биофизических методах, таких как белковая инженерия, микроскопический термофорез, спектроскопия ЯМР высокого разрешения и молекулярное моделирование. Мы показали, что пептид D3, будучи внутренне неупорядоченным белком (IDP), может динамически и специфически взаимодействовать IDP/IDP-подобным образом с мембраносвязанным предшественником $\text{A}\beta$, трансмембранным фрагментом APP672-726 ($\text{A}\beta_{1-55}$), являющимся субстратом γ -секретазы. Также было протестировано влияние ряда патогенных семейных мутаций болезни Альцгеймера, локализованных в различных структурных и функциональных частях APP, на связывание пептида D3. Полученные данные свидетельствуют о том, что пептид D3 напрямую распознает амилоидогенный примембранный участок APP ($\text{A}\beta_{17-26}$), ограничивая его конформационное разнообразие, сохраняя α -спиральность и предотвращая образование межмолекулярных водородных связей. Это позволяет ингибировать ранние стадии превращения $\text{A}\beta$ в β -конформацию характерную для малых токсичных $\text{A}\beta$ -олигомеров. Достигнутый прогресс в понимании молекулярного механизма действия D3-подобных пептидов является важным шагом на пути к разработке эффективной стратегии лечения и профилактики болезни Альцгеймера.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-64-46027).

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОР АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ

М.В. Воловик, О.В. Батищев *Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, РАН, Москва; Московский физико-технический институт, Долгопрудный*

С ростом устойчивых к классическим антибиотикам штаммов бактерий разработка новой антимикробной терапии становится актуальной задачей. Амфипатические антимикробные пептиды (АМП) являются перспективными антибиотиками, которые способны победить резистентные к классическим антимикробным препаратам штаммы болезнетворных бактерий. Для минимизации токсичного эффекта АМП на организм человека необходимо детальное понимание молекулярных механизмов формирования пор. Данная работа посвящена исследованию механизмов регуляции формирования пор антимикробными пептидами мелиттином и магаинином-1. С помощью метода пэч-кламп была получена кинетика изменения проводимости мембраны под действием пептидов. На основании полученных данных были сделаны выводы о механизмах регуляции формирования пор антимикробными пептидами. Адсорбция АМП в малых концентрациях на двух поверхностях бислоидной липидной мембраны препятствует изменению проводимости мембраны под действием высокой концентрации мелиттина и магаинина-1.

ПРЯМОЕ И ОТСТАВЛЕННОЕ ВО ВРЕМЕНИ ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ НЕЙРОРЕЦЕПТОРНЫХ СИСТЕМ КЛЕТОК МОЗГА (В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ПАТОЛОГИИ)

Т.В. Вьюнова, Л.А. Андреева, К.В. Шевченко, Н.Ф. Мясоедов

Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Предложен комплексный подход к исследованию молекулярных аспектов биологического действия нейропептидов. Метод охватывает следующие ключевые моменты: анализ и характеристику мест специфических взаимодействий пептидов на плазматических мембранах клеток-мишеней, влияние исследуемых пептидов как аллостерических модуляторов на функциональную активность ряда «классических» нейрорецепторов, а также анализ отставленных во времени эффектов влияния пептидов на нейрорецепторные системы клеток-мишеней (на изменения аффинности и плотности рецепторов) в норме и в условиях патологии. Были исследованы эффекты следующих пептидов: АКТГ(6-9)PGP, АКТГ(4-7)PGP, АКТГ(7-10)PGP, 5охо-Pro-Arg-Pro, PGPL. В качестве модели патологии использовали эмоциональное соматосенсорное угнетение – иммобилизацию подопытных животных в сочетании с резким непродолжительным акустическим воздействием. Параллельно было проведено исследование влияния указанных пептидов на эмоциональное состояние, когнитивные функции и болевую чувствительность животных в норме и на фоне стресса, а также проведен анализ глобальных изменений транскриптома гиппокампа крыс в ответ на стресс и/или введение нейропептидов. Показано, что само по себе стрессовое воздействие приводит к снижению числа доступных мест специфического связывания ГАМК (радиолиганда [³H]GABA) на соответствующих данному лиганду низкоаффинных сайтах (на 30% от контроля), при этом аффинность рецепторов не изменяется. Введение исследованных пептидов, в большинстве случаев, тоже приводит к снижению числа доступных сайтов связывания ГАМК. Эффекты введения пептидов на фоне стресса в значительной степени обусловлены структурой пептида – так, например, пептид АКТГ(4-7)PGP нивелирует указанный выше эффект в отношении связывания ГАМК, пептид АКТГ(6-9)PGP не влияет на действие стресса, а сочетанный эффект от действия стресса и введения пептида АКТГ(7-10)PGP носит новый характер, отличный от индивидуальных эффектов стресса либо пептида. Работа проведена при поддержке гранта РФФИ-КОМФИ № 17-00-00104 и программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии”.

РОЛЬ БЕЛКОВ НАН_0237 – НАН_0243 В СБОРКЕ ТАТ-НИТЕЙ ГАЛОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *HALOARCUA HISPANICA*

А.В. Галева, А.С. Сюткин, М.Г. Пятибратов

Институт белка РАН, Пушчино

Нами впервые был идентифицирован новый тип поверхностных структур галофильных архей – Tat-нити. Такое название обусловлено тем, что мажорный белок *Har. hispanica* НАН_0240, из которого строятся данные филаменты, секретируется с использованием Tat-пути (от англ. twin-arginine translocation pathway). Все известные до настоящего момента поверхностные структуры архей и бактерий (жгутики, пилы и др.) собираются из белковых субъединиц, секретирующихся по Sec-пути. Ни одного случая использования Tat-пути при сборке полимерных нитевидных структур не было описано. Таким образом, обнаруженные нами филаменты являются уникальными в своем роде структурами.

Сравнительный анализ известных геномов архей показал, что гомологи белка НАН_0240 обнаруживаются у большинства представителей рода *Haloarcula*, трёх видов рода *Haloferax*, а также у ряда представителей рода *Halorubrum*. Анализируя окружение гена *hah_0240* и его гомологов, мы идентифицировали кластер ассоциированных с ним шести консервативных генов (с *hah_0237* по *hah_0243*). Функции большинства из них не установлены. Более детальный анализ белковых продуктов данных генов показал, что два из них – НАН_0239 и НАН_0242, подобно НАН_0240, имеют в своем составе двуаргининовый мотив, указывающий на одинаковый путь секреции (Tat-путь). Наличие ламинин-подобного домена в составе белка НАН_0242 может указывать на адгезивные свойства Tat-нитей. Белок НАН_0243 относят к семейству сигнальных пептидаз I типа. Мы предполагаем, что данная пептидаза участвует в процессинге белков НАН_0239, НАН_0240 и НАН_0242. Функции остальных белков остаются неизученными. С большой долей вероятности все белки обнаруженного кластера участвуют в сборке и секреции Tat-нитей.

Молекулярное моделирование с помощью серверов для предсказания и сравнения пространственных структур белков AlphaFold Colab и DALI позволило выявить структурное сходство белков НАН_0239 и НАН_0240 с бактериальными белками (FimA/PapA) адгезивных пилей I-типа и P-типа, которые являются одним из важных факторов вирулентности патогенных бактерий. Данное сходство может указывать на то, что Tat-нити способны выполнять подобную пиллям I-типа функцию: обеспечивать адгезию клеток к различным поверхностям или субстратам.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-04-01327.

МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ МУТАНТНОГО p53 ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДАЗОЛА

Д.Р. Давлетшин¹, Э.М. Хусаинова¹, Р.Р. Хадиуллина¹, М. Бауд², Э.Р. Булатов^{1,3}

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

²Университет Саутгемптона, Великобритания; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина

и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Онкогенная мутация p53Y220C является девятой наиболее распространенной мутацией белка p53. Мутация Y220C создает расширенный поверхностный карман в ДНК-связывающем домене, благодаря чему белок быстро разворачивается и денатурируется при физиологических условиях, что негативно влияет на эффективность p53-зависимого сигналинга и приводит к развитию опухоли. В данной работе были исследованы новые производные индазола в качестве модуляторов активности мутантного p53. Обнаружено, что данные соединения связываются с мутантным белком p53 и стабилизируют его структуру *in vitro*. В работе были использованы клеточные линии карциномы молочной железы человека (MCF7 p53wt, MCF7 p53Y220C, MCF7 p53-/-) и гепатокарциномы человека (HUN7 p53Y220C). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью колориметрического MTS теста. Клетки обрабатывали соединениями в диапазоне концентраций 0–200 мкМ. Полученные данные были обработаны в программе GraphPad Prism. Экспрессию генов-мишеней p53 при обработке соединениями также определяли количественно с использованием количественной ПЦР в реальном времени (RT-qPCR). Жизнеспособность клеток, инкубированных с соединениями, определяли для клеточных линий с различным статусом p53. Для клеток с p53 дикого типа (MCF7 p53wt), а также для клеток с нокаутом по гену TP53 (MCF7 p53-/-), значения IC50 не удалось определить в выбранном диапазоне концентраций, в то время как в клетках с мутантным p53 значения IC50 были определены в диапазоне 32–55 мкМ. Обнаружено, что экспрессия PUMA (BBC3) повышается в клетках HUN7 p53Y220C и MCF7 p53Y220C при обработке соединениями. Результаты показали, что соединения оказывают селективное воздействие на клетки, несущие мутацию Y220C в белке p53. Было установлено, что соединения избирательно снижают жизнеспособность клеточных линий с p53Y220C и повышают транскрипцию генов-мишеней p53, связанных с апоптозом.

Работа профинансирована за счет гранта Российского научного фонда 22-24-20034 и поддержана Программой стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ АНАЛИЗА СВЯЗЫВАНИЯ GPCR С ЛИГАНДАМИ

Д.Е. Дашевский, А.П. Лугинина, П.А. Хорн, А.В. Мишин

Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва

Рецепторы, сопряжённые с G-белком (GPCR), являются семейством трансмембранных белков, которые участвуют в передаче сигналов во многих физиологических процессах. Именно поэтому GPCR являются мишенями для огромного числа лекарственных препаратов, а задача поиска новых лигандов и анализ их взаимодействия с рецепторами является одной из ключевых в современной фармакологии. В настоящее время многие флуориметрические методы анализа взаимодействия лигандов с белками не адаптированы для проведения измерений с мембранными белками. Целью данной работы является разработка основанной на флуоресценции технологии для быстрого и точного измерения константы связывания GPCR с его лигандами. В качестве методов для решения поставленной задачи используется микромасштабный термофорез (MST), а также анализ теплового сдвига (TSA). MST основан на измерении подвижности молекул, меченых флуоресцентным красителем, в температурном градиенте. Связывание с лигандами вызывает изменение подвижности комплекса, что фиксируется прибором по локальному изменению интенсивности флуоресценции. MST выгодно отличается от других способов измерения константы связывания, тем что позволяет значительно облегчить пробоподготовку, сократить время проведения эксперимента и количество затрачиваемого образца. В методе TSA связывание с лигандом определяется по изменению температуры плавления белка. Температура плавления в наших экспериментах определяется при помощи изменения флуоресценции либо ароматических аминокислот белка, как в случае с наноразмерной сканирующей флуориметрией (nanoDSF), либо флуоресценции красителя 7-диэтиламино-3-(4'-малеимидилфенил)-4-метилкумарина (CPM). В результате проделанной работы были получены данные по связыванию GPCR с агонистом и антагонистом рецептора. Для MST и TSA, использующего CPM, вычислены константы связывания для GPCR, находящегося в различных мембраномоделирующих системах, таких как митохондрии и нанодиски. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-74-00024.*

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКА M1 ВИРУСА ГРИППА А С ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ В ЭНДОСОМАХ

З.Г. Дениева, О.В. Батищев

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва

Вирус гриппа А является одним из представителей класса оболочечных РНК-вирусов. Данный вирус попадает в клетку путем эндоцитоза, в процессе которого закисление среды внутри клеточной эндосомы приводит к активации и конформационным перестройкам вирусного поверхностного белка гемагглютинина с последующим образованием поры слияния. Однако высвобождение вирусного генома в цитоплазму клетки требует разрушение каркаса из белков M1, расположенного под липидной оболочкой вируса. Белок M1 является консервативным для различных штаммов и участвует в нескольких стадиях жизненного цикла вируса. Тем не менее, роль M1 на стадии слияния вируса с эндосомой не до конца ясна. Используя различные модели липидных мембран, мы исследовали кинетику адсорбции белка M1 и показали, что он является активным участником процесса перестройки вирусной мембраны на стадии эндоцитоза. Понижение pH с 7.0 до pH 5.0 приводит к разрушению мембраны с адсорбированным на ней белком M1, причем эффект зависит от липидного состава бислоя. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-54-14006).*

ЭПИЛЕПСИЯ МЕНЯЕТ ПОСТ-ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ АЦИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ МОЗГА

Л.Г. Завилейский¹, В.А. Алешин^{2,3}, А.В. Артюхов^{2,3}, Т. Кэне⁴, М.В. Маслова⁵, А.В. Граф^{2,5}, В.И. Буник^{1,2,3}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Кафедра биохимии, Сеченовский университет, Москва;

⁴Институт экспериментальной внутренней медицины, Магдебургский университет Отто фон Герике, Магдебург, Германия; ⁵Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Ацилирование остатков лизина белков с участием ацил-КоА сопрягает сигнальные каскады с центральным метаболизмом. В связи с аномальным расходом энергии при эпилептических судорогах мы предположили, что ацилирование белков при эпилепсии может меняться и быть мишенью терапевтических воздействий. Целью данной работы была характеристика системы ацилирования белков коры мозга крыс при одиночном приступе и хронической эпилепсии.

Для решения поставленных задач использовали животную модель вызываемой пентилентетразолом (ПТЗ) эпилепсии. В гомогенатах коры мозга крыс измеряли уровни ацилирования белков, активностей дегидрогеназ 2-оксоислот и экспрессии сиртуинов 2 (*SIRT2*), 3 (*SIRT3*) и 5 (*SIRT5*).

Белковая экспрессия продуцента ацетил-КоА ПДГ и деацетилазы *SIRT2* после судорог не меняется. Напротив, экспрессия деацетилазы *SIRT3* и деацетилазы отрицательно заряженных ацилов, *SIRT5*, падает после хронических судорог по сравнению с контролем и одиночным приступом. Животные после одиночного и хронических приступов отличаются и по активности продуцента сукцинил-КоА 2-оксоглутаратдегидрогеназы. Для сравнительного анализа уровней ацилирования белков в контрольных, подвергшихся одиночному приступу и хронической эпилепсии животных было найдено 99 сайтов ацилирования в 62 белках. Уровень ацилирования 11 из этих сайтов отличается после одиночной и/или хронической эпилепсии по сравнению с контролем, но не между собой. Снижение после судорог малонилирования E2 компонента пируватдегидрогеназного (ПДГ) комплекса и глутарилирования фосфоглицератмутаза указывает на нарушение энергетического метаболизма. При этом отрицательно заряженные ацилирования отрицательно коррелируют с экспрессией *SIRT5*, и положительно - с экспрессией *SIRT2*. Для ацетилирования разных белков нет единого тренда корреляций с сиртуинами. Ацилирование по большинству сайтов не коррелирует с измеряемыми в гомогенатах коры мозга активностями соответствующих типов дегидрогеназ 2-оксоислот.

Таким образом, индуцируемая ПТЗ эпилепсия меняет ацилирование белков, причем система отрицательно заряженных ацилирований меняется в большей степени, чем система ацетилирований. Определяющий вклад в уровень отрицательно заряженных ацилирований вносит катализируемое *SIRT5* деацилирование и доступность сайтов ацилирования, контролируемая *SIRT2*. Работа поддержана грантом РНФ № 18-14-00116.

СИСТЕМА RtcB2-PrfH СПАСАЕТ КЛЕТКИ *E. COLI* ATCC 25922 ОТ ДЕЙСТВИЯ КОЛИЦИНА E3 *IN VIVO*

А.С. Зареченская^{1,2}, Т.П. Мавиза¹, Н.Р. Бурмистрова², А.С. Чуб², П.В. Сергиев^{1,2}, О.А. Донцова^{1,2,3}, О.Ю. Буренина¹, И.А. Остерман^{1,2,4}

¹Сколковский институт науки и технологий, Москва; ² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ⁴Научно-технологический университет Сириус, Сочи

Стремясь выжить и процветать, виды бактерий постоянно взаимодействуют и конкурируют за ресурсы и пространство в микробной экосистеме. Таким образом, они приспособились использовать различные антибиотики и токсины для борьбы со своими соперниками и одновременно развили способность противостоять направленному против них оружию. Некоторые бактерии содержат колициногенные плазмиды, кодирующие токсины, нарушающие работу трансляционного аппарата. Один из них, риботоксин колицин E3, опосредует расщепление 16S рРНК в декодирующем центре рибосомы [1]. Чтобы избежать гибели от действия подобных риботоксинов, конкурирующие бактерии смогли выработать механизмы защиты. Недавнее исследование продемонстрировало роль белков PrfH и RtcB2 в спасении поврежденной рибосомы и последующем повторном лигировании 16S рРНК *in vitro* [2]. Гены *rtcB2-prfH* сосуществуют как соседние гены в опероне, который спорадически распространяется среди разных бактерий [3]. В текущем исследовании мы показали, что система RtcB2-PrfH придает устойчивость к действию колицина E3 в клетках *E. coli* ATCC25922 *in vivo*. Жизнеспособность штамма *E. coli* ATCC25922, лишённого генов *rtcB2* и *prfH*, снижается под действием колицина E3, в отличие от штамма дикого типа, имеющего интактные гены *rtcB2* и *prfH*. Комплементация штамма, нокаутного по генам *rtcB2* и *prfH*, плазмидой, кодирующей либо ген *rtcB2*, либо оба гена из оперона *rtcB2-prfH*, восстанавливала устойчивость к колицину E3. Данные результаты свидетельствуют о работе системы спасения, которая, возможно, эволюционировала, чтобы помешать активности колицина E3. Работа проводится при поддержке гранта РНФ 20-74-10031.

Литература

1. Ng, C.L et al, Structural basis for ribosomal 16S rRNA cleavage by the cytotoxic domain of colicin E3. Nat. Struct. Mol. Biol. 2010, 17, 1241–1246. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1896>.
2. Yannan Tian et al, Sequential rescue and repair of stalled and damaged ribosome by bacterial PrfH and RtcB. bioRxiv 2021.09.22.461353; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.09.22.461353>
3. Baranov PV et al, Diverse bacterial genomes encode an operon of two genes, one of which is an unusual class-I release factor that potentially recognizes atypical mRNA signals other than normal stop codons. Biol Direct. 2006;1:28. Published 2006 Sep 13. doi:10.1186/1745-6150-1-28

ЛИПИД-БЕЛКОВЫЙ СИНЕРГИЗМ В РЕГУЛЯЦИИ ФОРМЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Д.В. Ивченков¹, А.М. Варижук¹, И.А. Лацис¹, В.Н. Лазарев¹, П.В. Башкиров^{1,2}

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Клеточные мембраны формируют сложные динамическая структуры, которые для поддержания процессов жизнедеятельности должны определенным образом менять свою геометрию. Изменение формы и топологии мембранных структур в клетке происходит в результате скоординированной во времени и пространстве работы специальных белков. Существует несколько принципиально различных молекулярных механизмов, лежащих в основе морфогенеза клеточной мембраны, и во всех из них липидному бислою отводится пассивная роль объекта, деформируемого белками за счет: полимеризации, моторной деятельности, ферментативной активности, макромолекулярной скупенности (т.н. «краудинг»), а также вставки амфифильной спирали на границу раздела полярной/гидрофобной области липидного бислоя. Что касается последнего механизма, впервые предложенного для объяснения роли домена ENTH белка эпсина в создании начальной инвагинации при эндоцитозе, относительно недавно было выдвинуто предположение, что амфифильная спираль в этом белке, как и во многих других периферийных белках со схожими функциями, выполняет исключительно роль «якоря», закрепляющего белок на мембране, а деформация мембраны происходит только за счет стерического взаимодействия белков на поверхности - краудинга. В данной работе мы оспариваем исключительность якорной функции мембран-взаимодействующих амфифильных мотивов периферийных белков. На примере Н0 пептида ENTH домена, а также искусственно созданных пептидов с похожим гидрофобным профилем, нами проведено исследование их влияния на геометрические и упругие характеристики липидного бислоя. Методом кругового дихроизма показано, что все исследуемые пептиды формируют альфа спираль на поверхности мембраны. Используя липидные нанотрубки (НТ), вытянутые из бислоевых липидных мембран, мы смогли установить, что адсорбция пептидов приводила к сужению НТ за счет уменьшения измеряемой изгибной жесткости мембраны. Уменьшение имело предельный характер, после снижения жесткости вдвое модуль изгиба оставался неизменным при увеличении концентрации пептида в омывающем НТ растворе. Установлено, что эффективное размягчение мембраны происходило вследствие сопряжения, возникающего между ее геометрической кривизной и поверхностной плотностью спиралей. Показано, что все исследуемые пептиды индуцировали спонтанную тубуляцию – формирование мембранных трубочек, на поверхности ненатянутых гигантских однослойных липосом, но только, если в составе их мембран присутствовал не-бислоевый липид фосфатидилэтаноламин (ФЭ). Причем равновесный радиус образующихся трубочек соответствовал монослойной спонтанной кривизне. На основании полученных данных мы делаем вывод о существовании универсального механизма регуляции геометрической кривизны мембран, в основе которого лежит липид-белковый синергизм – амфифильные спирали размягчают внешний монослой мембраны, в то время как не скомпенсированный изгибный момент, индуцируемый не-бислоевыми липидами, во внутреннем монослое заставляет мембрану принять кривизну, при которой момент исчезнет.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-15-00265

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕНЫ КЛЮЧЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ НА КОНФОРМАЦИОННУЮ ДИНАМИКУ FE(II)/2OG-ЗАВИСИМОЙ ДИОКСИГЕНАЗЫ ALKBH3 ЧЕЛОВЕКА

Л.Ю. Канажевская¹, В.В. Коваль^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Алкилирование оснований ДНК агентами эндогенного и экзогенного происхождения оказывает цитотоксическое действие на клетку и может приводить к закреплению опасных мутаций. Репарация алкильных повреждений осуществляется, в том числе, с участием Fe(II)/2-оксоглутарат-зависимых ДНК-диоксигеназ. Диоксигеназы из семейства AlkB катализируют прямое удаление алкильных групп с азотистых оснований ДНК и РНК. Принадлежность к данному структурному семейству определяется наличием консервативного β-складчатого домена DSBH, ответственного за катализ, и домена узнавания поврежденных нуклеотидов NRL, который дискриминирует и связывает алкилированные основания. Гомологи диоксигеназы AlkB из *E.coli* широко представлены у эукариот, при этом их субстратная специфичность и функции в клетке существенно отличаются. Настоящая работа посвящена исследованию диоксигеназы ALKBH3 человека, повышенный уровень экспрессии которой был обнаружен в клетках различных опухолей. Предпочтительными субстратами ALKBH3 являются N1-метиладенин и N3-метилцитозин в составе одноцепочечной ДНК и РНК. Предполагается, что данный фермент участвует в репарации одноцепочечных фрагментов нуклеиновых кислот в процессах репликации и трансляции, что может обеспечивать устойчивость опухолевых клеток к алкилирующим агентам. К настоящему времени методом рентгено-структурного анализа охарактеризована структура свободного фермента ALKBH3 с ионом металла и молекулой 2OG в активном центре, в то время как комплекс белка с ДНК-субстратом получить не удалось. Поэтому остается открытым вопрос, какие аминокислотные остатки участвуют в узнавании и связывании поврежденной ДНК. Целью настоящей работы было изучение роли отдельных аминокислотных остатков в ферментативном процессе, катализируемом диоксигеназой ALKBH3. В ходе работы методом сайт-направленного мутагенеза были получены мутантные формы фермента, содержащие замены консервативных остатков Tyr143, Leu177 и His191, проанализирована их активность по отношению к модельным ДНК-субстратам. Методом КД-спектроскопии исследовано влияние замен на вторичную структуру ALKBH3. Методом «остановленного потока» охарактеризована конформационная динамика мутантных форм и фермента дикого типа в ходе каталитического цикла в предстационарных условиях. *Работа поддержана грантом РФФИ №22-24-00699.*

МИКРОМАСШТАБНЫЙ ТЕРМОФОРЕЗ В ИССЛЕДОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ЦИТОХРОМОВ P450 С АЗОЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ И БЕЛКАМИ-ПАРТНЕРАМИ

И.А.Капранов¹, М.А.Карпова², Ю.А.Загрядская¹, И.С.Охрименко¹, Т.С.Варакса³, А.А.Гилеп^{3,4}, Н.В.Струшкевич², В.И.Борщевский¹

¹Московский физико-технический институт (НИУ), Москва; ²Сколковский институт науки и технологий, Москва; ³Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; ⁴НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Цитохромы P450 – широко распространенные белки, участвующие в синтезе и метаболизме стероидов, ненасыщенных жирных кислот и фенольных производных, а также задействованные в выведении из клетки чужеродных веществ [1]. Ранее было показано, что соединения азольного ряда, ингибирующие активность цитохромов P450, подавляют рост *Mycobacterium tuberculosis* – возбудителя туберкулеза, одного из самых смертоносных заболеваний [2]. В предыдущих работах мы показали, что CYP124, CYP125 и CYP142 могут связываться с метаболитами ряда иммуноактивных оксистеролов человека *in vitro* [3], а также участие CYP124 в метаболизме противотуберкулезного соединения, находящегося на стадии клинических испытаний [4]. Таким образом, ингибирование цитохромов P450 является перспективной стратегией для разработки новых противотуберкулезных препаратов. Существующие методы исследования взаимодействия цитохромов P450 с лигандами имеют ряд ограничений. В настоящей работе мы использовали альтернативный метод – микромасштабный термофорез (MST), который не использовался ранее для изучения цитохромов P450. Полученные кривые MST были использованы для расчета констант диссоциации CYP124 с рядом азольных соединений. Полученные значения констант сравнимы с таковыми, рассчитанными из спектрофотометрического титрования. Таким образом, MST может быть использован для изучения связывания цитохромов семейства P450 с низкомолекулярными лигандами, особенно в тех случаях, когда классические подходы неприменимы. Данная работа была поддержана совместным исследовательским грантом Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Б20Р-061) и Российского фонда фундаментальных исследований (20-54-00005).

ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ОКСИТИАМИНА НА ГЛУТАРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ КРЫСЫ

И.С. Карлина¹, А.В. Граф^{2,3,4}, Д.А. Сибирякина⁴, О.Н. Соловьева², В.И. Буник^{5,6,7}

¹Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Сеченовского Университета; ²НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия; ³Факультет нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных наук и технологий, Московский физико-технический институт; ⁴Биологический факультет МГУ; ⁵Факультет биоинформатики и биоинженерии МГУ; ⁶Факультет биологической химии Сеченовского Университета; ⁷Отдел биокинетики НИИ ФХБ им.А.Н. Белозерского МГУ, Москва

Глутарилирование – одна из регуляторных пост-трансляционных модификаций (ПТМ) белков, усиливающаяся в ряде патологий включая злокачественную трансформацию. Глутарилирующий агент - глутарил-КоА – образуется в ходе 2-ОАДГ реакции, которую катализирует кодируемая геном DHTKD1 тиаминдифосфат (ТДФ)-зависимая 2-оксоадипат дегидрогеназа (ОАДГ), участвующая в катаболизме лизина и триптофана. Целью работы было определить взаимосвязь функции ОАДГ и глутарилирования белков. В качестве регулятора ОАДГ крысам вводили окситиамин (ОТ) (1,5 мг/кг ежедневно в течение 30 дней), дифосфолирированная форма которого блокирует ТДФ-зависимые ферменты. По завершении физиологического наблюдения крыс декапитировали и извлеченные ткани замораживали при -70 С до дальнейшего анализа. Индикатором нарушения функции ТДФ-зависимых ферментов после введения крысам ОТ служило снижение уровня ТДФ в печени. Одновременно ОТ снижал общее глутарилирование белков печени и глутарилирование соответствующих ОАДГ белковых полос, тогда как белковая экспрессия ОАДГ возрастала. В коре мозга эффекты были выражены в существенно меньшей степени, что соответствовало отсутствию падения ТДФ в мозге. При анализе физиологических параметров наблюдали двухфазный эффект ОТ. По сравнению с контрольной группой, вес и потребление пищи росли в течение первых 15 дней и падали в последующие 15 дней, когда падало и потребление воды. Вторая фаза сопровождалась изменением ряда физиологических параметров обработанных ОТ крыс, свидетельствовавших о росте тревожности и не наблюдавшихся в контрольной группе. Можно заключить, что дефицит тиамина вызывает снижение глутарилирования белков за счет пониженной продукции глутарил-КоА, зависящей от функции ТДФ-зависимой ОАДГ. Рост белковой экспрессии ОАДГ является компенсаторным ответом на возникающий у обработанных ОТ крыс дефицит функции ОАДГ. Изменения глутарилирования и экспрессии ОАДГ сопровождают патологические изменения поведения животных, свидетельствующие о действии ОТ в качестве антагониста тиамин. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 18-14-00116).

ВЛИЯНИЕ SNP-АССОЦИИРОВАННЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН НА ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ В ЧЕЛОВЕКА

О.А. Кладова, Т.Е. Тюгашев, Е.С. Микушина, Д.С. Новопашина, О.С. Федорова, Н.А. Кузнецов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

ДНК-полимераза β (Pol β) является одной из основных ДНК-полимераз, участвующих в пути эксцизионной репарации оснований (BER), который играет важную роль в удалении поврежденных оснований ДНК. Экспрессия Pol β является необходимой для ответа клетки на возникновение повреждений в ДНК, появляющихся как в ходе естественных клеточных процессов, так и под воздействием внешних факторов. Возникновение «дефектных» вариантов Pol β , например, связанных с однонуклеотидными полиморфизмами (SNP) в гене фермента, может приводить к преждевременному старению, онкологическим и нейродегенеративным заболеваниям. В связи с этим важной задачей является установление возможных причин снижения активности Pol β из-за возникновения конкретных точечных мутаций. В настоящий момент существует большое количество биоинформатических подходов, позволяющих предсказывать влияние однонуклеотидных замен на функцию белка. В данной работе был выполнен анализ более 8000 известных полиморфизмов Pol β с целью выявления замен аминокислотных

остатков, способных оказывать влияние на функционирование Polβ. Сравнительный анализ эффектов, вызванных данными полиморфизмами, был проведен с использованием шести программ SIFT, PolyPhen, CADD, REVEL, MetaLR и Provean и позволил отобрать 22 замены, обладающие потенциально негативным эффектом. В рамках представленной работы из 22 отобранных замен с помощью сайт-направленного мутагенеза были получены 4 SNP-варианта фермента, содержащих замены E154A, G189D, M236T и R254I. Анализ предстационарной кинетики процесса взаимодействия SNP-вариантов с ДНК и dNTP, позволил установить параметры образования фермент-субстратного комплекса и рассчитать константы присоединения dNTP к ДНК. Прямой анализ накопления продукта реакции методом гель-электрофореза показал, что SNP-варианты Polβ обладают сниженной эффективностью присоединения dNTP к ДНК. Установлено, что замены E154A, G189D, M236T и R254I приводят к снижению эффективности образования комплекса с ДНК и dNTP. Таким образом, проведенный биоинформатический скрининг SNP-вариантов Polβ и экспериментальная проверка ферментативных свойств отобранных вариантов позволяют заключить, что общая эффективность процесса BER может быть существенно снижена за счет данных SNP. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-74-10103.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ АДДИТИВОВ НА РЕФОЛДИНГ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS OCHRACEUS* ВКМ-F4104D

С.К. Комаревцев¹, А.А. Осмоловский², К.А. Мирошников³

¹Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Микромицет *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D является продуцентом секретируемой щелочной протеазы, обладающей фибринолитической и активаторной по отношению к протеину С плазмы крови активностями. В результате ранее проведенных исследований была показана перспективность использования данной протеазы в ветеринарных, медицинских и диагностических сферах применения. В качестве экспрессионной конструкции использовали плазмиду pET23d (Novagen), несущую кодирующую последовательность пропептидного и протеазного домена целевого фермента, а также С-концевой 6xHis-tag, склонированные по рестриктивным сайтам NcoI и XhoI. Для проведения экспрессии выращивали культуру свежотрансформированных клеток штамма *E. coli* BL21 (DE3) до OD600~0,6, после чего проводили индукцию белкового синтеза добавлением IPTG до конечной концентрации 0,5 мМ и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Полученную биомассу гомогенизировали ультразвуком, осаждали фракцию тел включения центрифугированием, после чего солибилизовали их в 8 М мочеvine, 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0. В качестве кандидатных рефолдирующих агентов для исследования использовали доступные для масштабного применения в промышленности вещества, такие как сульфат аммония, аргинин, глицерин, сахароза, твин и тритон Х-100. Для проведения рефолдинга использовали разбавление солибилизата тел включения в исходной концентрации 0,1 мг/мл в 20 раз в рефолдирующем буфере с исследуемыми аддитивами при комнатной температуре. В качестве рефолдирующего буфера использовали 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ СаCl₂. Наибольший выход правильно свернутой формы фермента наблюдали при использовании сульфата аммония, глицерина и сахарозы в качестве аддитивов для рефолдинга. В то же время аргинин и детергенты оказали отрицательное влияние на эффективность технологического процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (номер проекта 20-16-00085). Вклад авторов: получение и обработка результатов – Сергей Комаревцев, анализ и обсуждение результатов – Александр Осмоловский, общее руководство работой – Константин Мирошников.

МЕТАНОЛ-ИНДУЦИРУЕМЫЙ ГЕН *MIG21 NICOTIANA BENTHAMIANA* КОДИРУЕТ ЯДЕРНЫЙ БЕЛОК, ВЛИЯЮЩИЙ НА МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ И ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ ТРАНСПОРТ

Е.В. Шешукова¹, А.А. Кудряшов¹, Н.М. Ершова¹, К.А. Камарова^{1,2}, Т.В. Комарова^{1,2}

¹Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, ²МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Механическое повреждение тканей растений приводит к активации пектинметилэстеразы, участвующей в образовании метанола и его эмиссии в атмосферу. Газообразный метанол, выделяемый поврежденным растением, индуцирует устойчивость к бактериальным патогенам у соседних растений, но в то же время способствует распространению вирусной инфекции. Среди метанол-индуцируемых генов *Nicotiana benthamiana*, большинство связано с защитными реакциями растений, в том числе, с активацией межклеточного транспорта (Dorokhov et al., 2012). Один из генов, *MIG21*, кодирует ранее не охарактеризованный белок длиной 209 а.к. (*MIG21p*), богатый остатками глутамина и содержащий четыре 9-а.к. повтора (ACHGKTQQ). *MIG21p* не имеет гомологии с аннотированными белками. Анализ а.к. последовательности *MIG21p* с помощью сервиса LOCALIZER (<https://localizer.csiro.au/>) (Sperschneider et al., 2017) показал, что в составе *MIG21p* имеется участок длиной 19 а.к., содержащий сигнал ядерной локализации (NLS). Кроме того, с помощью сервиса NoD (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-nod/index.jsp>) был предсказан сигнал ядрышковой локализации длиной 25 а.к., частично перекрывающийся с потенциальным NLS *MIG21p*. Анализ распределения *MIG21p*, слитого с YFP, в клетках листьев *N. benthamiana* показал, что *MIG21p*-YFP имеет ядерную локализацию, при этом отчетливо детектируются его скопления в ядрышке и субъядерных структурах. Повышенная экспрессия *MIG21* приводит к подавлению ядерного импорта белков, содержащих NLS, что было продемонстрировано на модельном белке GFP-NLS. Кроме того, индукция *MIG21* физиологическими концентрациями газообразного метанола сопровождается активацией межклеточного транспорта макромолекул и стимуляцией накопления вирусной РНК при заражении растения. Предположительно, *MIG21p* может участвовать в создании благоприятных условий для репродукции вируса следующими путями: (i) являясь локализованным в ядре белком, он препятствует ядерно-цитоплазматическому транспорту макромолекул, которые могут включать противовирусные клеточные факторы, и (ii) увеличивает проницаемость плазмодесмы, таким образом стимулируя движение вируса от клетки к клетке. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00895).

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ КАРОТИНОИД-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА АСТАР ИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Ф.Д. Корнилов^{1,2}, А.Г. Савицкая¹, С.А. Гончарук^{1,2}, Н.Н. Случанко³, К.С. Минеев^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Московский физико-технический институт, Долгопрудный; ³Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии РАН», Москва

AstaP – каротиноид-транспортирующий белок, выделенный из одноклеточных зеленых водорослей рода *Scenedesmus*. Изучение пространственной структуры AstaP представляет интерес как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения. Механизм функционирования данного белка неизвестен, а единственными гомологами с известной пространственной структурой являются фасцилин-подобные белки клеточной адгезии. Также AstaP рассматривается в качестве каркаса для создания потенциального агента доставки молекул каротиноидов, сильных антиоксидантов, которые могут выступать в качестве лекарственных средств против дистрофии сетчатки глаза и нейродегенеративных заболеваний. В данной работе был разработан протокол продукции изотопно-меченных образцов AstaP, были подобраны оптимальные условия для проведения ЯМР экспериментов и получения комплекса AstaP с молекулой астаксантина *in vitro*. Была определена пространственная структура AstaP в комплексе с молекулой астаксантина методами ЯМР-спектроскопии в растворе. Было установлено, что AstaP может связывать молекулу астаксантина двумя способами. Также была охарактеризована подвижность основной цепи AstaP, находящегося в комплексе с молекулой астаксантина. Для свободной формы AstaP удалось фрагментарно определить вторичную структуру. *Работа поддержана грантом Президента РФ № МД 2834.2022.1.4*

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ГЛОБАЛЬНОМУ ПРОФИЛИРОВАНИЮ УБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ

А.А. Кудряева, А.А. Белогуров

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

Убиквитинирование – важный биологический процесс, задействованный почти во всех аспектах жизни клетки и регулирующий множество клеточных функций. Невероятное разнообразие функций убиквитинирования обусловлено способностью убиквитина образовывать цепи различного типа ветвления посредством изопептидных связей между ε-аминогруппой одного из семи аминокислотных остатков лизина предыдущего убиквитина с С-концевой карбоксильной группой последующего убиквитина. Малый размер убиквитина (~8,5 кДа), а также сложный механизм образования цепей накладывает ограничение на возможные методы исследования. В данной работе нами были использованы методы прижизненного специфического внутриклеточного флуоресцентного мечения, а также флуоресцентной и люминесцентной белковой комплементации, что позволило получить качественно новые данные о метаболизме убиквитина. Нами впервые было точно установлено время полужизни убиквитина; равновесное количество молекул убиквитина на молекулу субстрата; безвозвратные потери убиквитина при деградации полиубиквитинированного субстрата протеасомой, а также crucialное влияние аминокислотного остатка K27 на стабильность убиквитина. Проведенное глобальное профилирование стабильности полиубиквитиновых цепей различного типа ветвления свидетельствует, что характер связи между остатками убиквитина придает уникальные структурные и динамические свойства полиубиквитиновым цепям, позволяя эукариотическим клеткам использовать убиквитиновую комбинаторику для регуляции сотен биологических процессов.

Работа была поддержана проектом РНФ № 21-74-10154.

ЭВОЛЮЦИЯ МЕХАНИЗМА СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ФЕРМЕНТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЯХ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК

Н.А. Кузнецов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Модифицированные азотистые основания удаляются по пути эксцизионной репарации оснований (BER). Процесс BER начинается с действия ДНК-гликозилаз, которые находят поврежденные основания в геномной ДНК среди десятков миллионов неповрежденных оснований и катализируют их удаление путем гидролиза N-гликозидной связи между гетероциклом и C1'-атомом остатка 2'-дезоксирiboзы. В клетках человека 11 различных ДНК-гликозилаз постоянно и независимо участвуют в поиске и удалении окисленных, алкилированных или неканонических оснований. Образовавшийся в результате N-гликозидной реакции апуриновый/апириимидиновый (AP) сайт далее подвергается превращению либо за счет AP-лиазной активности бифункциональных ДНК-гликозилаз, либо под действием AP-эндонуклеаз. Несмотря на то, что основной биологической функцией AP-эндонуклеаз является гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от AP-сайтов, было показано, что фермент способен гидролизовать фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от некоторых поврежденных нуклеотидов, таких как альфа аномеры природных нуклеотидов, этено и бензэтно производных азотистых оснований и некоторых поврежденных пиримидиновых оснований. Кроме того, AP-эндонуклеазы обладают 3'-5' экзонуклеазной активностью, что приводит к последовательному удалению природных немодифицированных 3'-концевых нуклеотидов. Анализ субстратной специфичности всех ферментов начальных стадий BER приводит к вопросу, каким образом активный центр данных ферментов осуществляет контроль субстратной специфичности. Интенсивное изучение кинетических механизмов конформационных перестроек ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеаз и их модельных ДНК-субстратов в процессах узнавания поврежденного нуклеотида, образования каталитического комплекса и катализа позволило предложить обобщенную модель узнавания повреждений, которая обеспечивает высокую субстратную специфичность практически всех ферментов репарации, узнающих поврежденные нуклеотиды в ДНК. Эта модель включает несколько ключевых стадий: 1) изгиб и разворачивание двойной спирали, 2) выворачивание поврежденного нуклеотида из ДНК в активный центр и 3) верификацию поврежденного основания в активном центре фермента путем образования специфических контактов.

Работа поддержана грантом РНФ № 21-64-00017.

ИССЛЕДОВАНИЕ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ БЕЛКА ProQ ИЗ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Н.В.Леконцева¹, М.Я.Столярская^{1,2}, А.Д.Никулин¹

¹Институт белка РАН, Пуцзино; ²Ярославский государственный медицинский университет МЗ РФ, Ярославль

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) является одним из наиболее опасных для человека полирезистентным оппортунистическим патогеном, способным вызывать как острые с летальным исходом, так и хронические легочные заболевания. В 2017 году ВОЗ включила ее в список бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, в связи с чем актуальной на сегодняшний день задачей является поиск новых мишеней и стратегий лечения заболеваний, вызванных данным патогеном. Исследования 2021 года по градиентному секвенированию РНК-белковых комплексов *Pseudomonas aeruginosa* показали, что белок ProQ является глобальным регулятором экспрессии многих генов и, способствуя взаимодействию малых регуляторных РНК и их целевых мРНК, может влиять на вирулентность, антибиотикорезистентность, формирование биопленок. Целью нашей работы стало изучение структурно-функциональных особенностей взаимодействия малых регуляторных РНК и белка РаеProQ. В рамках данной работы мы получили генетическую конструкцию, несущую ген белка ProQ из *Pseudomonas aeruginosa*, белок был наработан в препаративных количествах, была получена модель его вторичной структуры. Также нами было показано, что РаеProQ, как типичный представитель семейства ProQ/FinO, узнает специфическую вторичную структуру РНК, которая представляет собой шпильку с петлей на конце. РНК-шаперонная активность белка ProQ была исследована с использованием флуоресцентно-меченой РНК.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 8-ОКСОГУАНИН-ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА С ДНК-ДУПЛЕКСАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ОХОГ-СЛАМП НАПРОТИВ ПОВРЕЖДЕНИЯ

М.В. Лукина, П.В. Жданова, В.В. Коваль

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

8-Оксогуанин образуется в ДНК под действием активных форм кислорода. Это высоко мутагенное и самое распространенное окислительное повреждение ДНК, которое является важным маркером окислительного стресса в клетках. В организме человека за его своевременное удаление отвечает 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза человека (hOgg1). hOgg1 бифункциональная ДНК-гликозилаза, обладающая N-гликозилазной и АП-лиазной активностями. В настоящее время остаются актуальными вопросы, касающиеся детального механизма распознавания 8-оксогуанина среди неповрежденных оснований и его дальнейшего взаимодействия с аминокислотными остатками в активном центре фермента. 8-охоG-clamp – гетероциклическое соединение, обладающее флуоресценцией, которая селективно и значительно снижается при его взаимодействии в 8-оксогуанозиноме, оно было предложено в качестве сенсора для определения уровня этого повреждения в клетках (Nakagawa, Sasaki et al., NAR 2006). В нашей работе были использованы ДНК-дуплексы, моделирующие специфические для hOgg1 повреждения: 8-оксогуанин и апуриновый/апириимидиновый сайт, в комплементарной цепи напротив повреждения находился либо цитидин, либо охоG-clamp, соединенный N-гликозидной связью с рибозофосфатным остовом. Было показано, что в ходе реакции hOgg1 с дуплексом, содержащим 8-охоG-clamp, не происходит гидролиза N-гликозидной связи и удаления повреждения из цепи. Возможные причины потери ферментативной активности были изучены с использованием кинетического метода «остановленной струи» и молекулярного моделирования. Основание напротив повреждения оказывает значительный эффект на протекание начальных этапов образования фермент-субстратного комплекса, охоG-Clamp препятствует выворачиванию поврежденного основания в карман активного центра фермента. Полученная 3D-модель комплекса hOgg1 с ДНК и 8-охоG-clamp, в совокупности с кинетическими данными, позволила прояснить роль контактов аминокислотных остатков с ДНК в процессе образования и перестроек в фермент-субстратном комплексе.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-24-00699.

НЕГАТИВНАЯ МОДУЛЯЦИЯ ЛИЗОФОСФОЛИПИДНОГО РЕЦЕПТОРА S1P5

Е.А. Ляпина¹, Е.В. Марьин¹, А.Ю. Гусач¹, Ф.С. Орехов¹, А.С. Герасимов², А.П. Лугинина¹, Д.Д. Вахрамеев¹, М.М. Эргашева¹, Г.А. Хусаинов¹, П. Попов¹, В.И. Борщевский¹, А.В. Мишин¹, В.Г. Черезов¹

¹Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт, Москва; ²Вятский государственный университет, Вятка

S1P является биологически активным лизофосфолипидом, узнаваемым рецепторами, сопряженными с G-белком. Он действует через пять различных подтипов S1P-рецепторов: S1P1-5. Несмотря на сходство аминокислотных последовательностей, эти рецепторы различаются по профилю экспрессии: S1P1-3 рецепторы экспрессируются во множестве тканей, S1P4 ограничен иммунной системой, а S1P5 присутствует в основном в нервной и иммунной системах. Последний регулирует миграцию клеток для NK-клеток и предшественников олигодендроцитов, играя роль в аутоиммунных, нейродегенеративных и онкогенных заболеваниях. Хотя FDA одобрило множество неселективных (финголимод) или двойных (действующих и на S1P1, и на S1P5) агонистов, до последнего года было доступно мало селективных модуляторов. Отсутствие таких модуляторов накладывает ограничения на исследования сигнализации через S1P5. Ускорить разработку лигандов S1P5 может наличие неактивной структуры рецептора. Для получения этой структуры ген S1P5 человека был модифицирован для успешной экспрессии в клетках насекомых, а также последующей очистке и кристаллизации в липидной кубической фазе. Кристаллы подверглись сбору данных с помощью фемтосекундной серийной кристаллографии при комнатной температуре на PAL-XFEL. Кристаллическая структура была решена с разрешением 2,2 Å, она демонстрирует S1P5 в неактивном состоянии в комплексе с обратным агонистом. Она показывает необычный способ аллостерического связывания лиганда, нацеленного на варабельный подкарман S1P-рецепторов, и открывает путь к разработке обратных агонистов.

Работа выполнена при поддержке гранта 22-74-10036 Российского научного фонда.

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОГО БЕЛКА НУКЛЕОБИНДИН 1 С РНК

А.О. Михайлина, О.С. Костарева, А.Е. Своєглазова, С.В. Тищенко

Институт белка РАН, Пущино

Более 30 лет назад нуклеобиндин 1 (NUCB1) был определён как фактор роста и дифференцировки В-клеток селезенки линии мышей, выведенных для исследования аутоиммунного заболевания – системной красной волчанки. К настоящему времени показано, что этот консервативный эукариотический белок вовлечен в процессы транспорта белковых молекул, стрессовый ответ клетки и регуляцию кальциевого обмена. Недавно NUCB1 был отнесён классу шаперон-подобных амилонд-связывающих белков. NUCB1 является фактором транскрипции, связываясь с E-box последовательностью ДНК. Белок NUCB1 ассоциирован с развитием болезни Альцгеймера, диабета 2-го типа, раковых и, возможно, аутоиммунных заболеваний. Таким образом, поиск «мишеней» NUCB1 и исследование механизмов взаимодействия весьма актуален. Мы впервые получили данные, свидетельствующие о взаимодействии NUCB1 с фрагментами некоторых эукариотических РНК, имеющих, преимущественно, шпильчатую структуру. Показано, что NUCB1 также образует стабильные комплексы с микроРНК, которые ассоциированы с развитием системной красной волчанки у человека. Более того, мы обнаружили, что NUCB1 способен разрушать («расплавлять») структуру РНК-шпильки. Была использована короткая шпильчатая РНК, на одном конце которой расположен флуорофор, а на противоположном – гаситель флуоресценции. В двухцепочечной форме, 5' и 3' концы такой РНК сближены и происходит гашение флуоресценции, а при взаимодействии с комплементарной РНК или белком – РНК-шапероном шпилька разворачивается, и флуоресценция появляется. Добавление NUCB1 к такому фрагменту РНК заметно повышает уровень флуоресценции. Таким образом, мы предполагаем, что NUCB1, наряду с функцией белкового шаперона, может выполнять роль РНК-шаперона. МикроРНК принимают участие в патогенезе аутоиммунных заболеваний через регуляцию ответа врождённого иммунитета и продукцию воспалительных факторов, связываясь с комплементарными участками на мРНК. NUCB1 может регулировать взаимодействие микроРНК с мРНК-мишенями путём «расплавления» дуплекса мРНК-микроРНК. Тем самым, предположительно, NUCB1 принимает участие в сетях взаимодействий микроРНК, вовлеченных в патогенез системной красной волчанки у человека.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ РЕПЕРТУАРОВ В-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ВИРУСА SARS-CoV-2

Ю.А. Мокрушина¹, С.С. Терехов¹, Д.М. Малабуёк¹, Л.А. Овчинникова¹, В.А. Абрикосова¹, Я.А. Ломакин¹, И.В. Смирнов^{1,2}, А.Г. Габибов^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²НМИЦ эндокринологии;

³МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Пандемия новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 потребовала разработки быстрых и эффективных технологий для поиска вируснейтрализующих антител как потенциальных терапевтических средств. Традиционные комбинаторные библиотеки пар легких и тяжелых цепей антител создаются путем случайного спаривания амплифицированных генов VH и VL из человеческих В-клеток, что приводит к получению большого набора искусственных антител, которые в большинстве случаев лишены функций. В настоящей работе мы использовали новый подход к получению библиотек антител из образцов крови лиц, вакцинированных препаратами на основе мРНК (Pfizer/BioNTech) или аденовируса (Sputnik V). На первом этапе работы В-клетки выделяли из крови и инкапсулировали в капли микрофлюидной эмульсии из расчета одна клетка в капле совместно с реагентами для лизиса и oligo-dT микросферами для создания реплик транскриптома индивидуальной клетки. На втором этапе для повторно инкапсулированных микросфер проводили эмульсионную ПЦР с обратной транскрипцией с набора вырожденных праймеров, варибельные домены тяжелых (VH) и легких (VL) цепей антител из каждой клетки физически связывали друг с другом за счет перекрывающихся последовательностей серин-глицинового линкера, что позволило получить репертуар природных (нативно спаренных) одноцепочечных антител. Полученные библиотеки одноцепочечных антител (VH-VL) подвергали скринингу с использованием дрожжевого дисплея для поиска антител против RBD домена S белка вируса SARS-CoV-2. Полезным преимуществом дрожжевой системы с заякоренными на поверхности одноцепочечными антителами является возможность скрининга полученной нативно-спаренной библиотеки на любые антигены SARS-CoV-2, включая новые варианты штаммов вируса. Мы использовали два варианта скрининга для отбора различных популяций антител – конкурентное связывание дрожжевых клеток с антигеном в присутствии растворимой части ACE2-рецептора и связывание с чрезвычайно низкой концентрацией антигена. В результате мы отобрали панель антител, которые эффективно нейтрализуют вирус SARS-CoV-2 в псевдовиральной системе, в том числе в субнаномолярных концентрациях. Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2021-1049.

НАТРОНОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ ИСПОЛЬЗУЮТ ИОНЫ НАТРИЯ В ЭНЕРГЕТИЧЕСКОМ ЦИКЛЕ

М.С. Мунтян¹, М.Б. Вирасов¹, Д.А. Морозов¹, Д.Ю. Сорокин², В.П. Скулачев¹

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва;

²Дельфтский технологический университет, Биотехнология, Дельфт, Нидерланды

Гало- и алкалофильные бактерии *Thioalkalivibrio versutus* являются натронофилами, населяющими содовые озера с показателем pH 10 и выше. Протон-движущая сила (дельта-р) в таких условиях слишком мала для осуществления энергетических функций. Нами впервые продемонстрировано, что дыхание у этих бактерий осуществляется при помощи Na⁺-транслоцирующей цитохром-с оксидазы (CO) [1]. Фермент генерирует на плазматической мембране бактерий натрий-движущую силу (дельта-с), величина которой может достигать -270 мВ [2]. Однако функционирование у этих бактерий дельта-с-потребителей не было описано. Мы разработали методику получения подвижных клеток [3] и использовали подвижность для доказательства у этих бактерий натриевого энергетического цикла, состоящего из дельта-с-генератора и дельта-с-потребителя. Подвижность активировалась в присутствии протонофора N-оксида 2-гептил-4-гидроксинолина (HQNO), как

и дыхательная активность, но полностью блокировалась, ингибитором флагеллярного мотора Na⁺-типа амилоридом. У неподвижных бактерий, истощенных по эндогенным субстратам, аскорбат (искусственный субстрат дыхания на концевом участке) инициировал дыхание и подвижность, причем обе функции обнаруживали одинаковую зависимость от концентрации натрия. Эти результаты свидетельствуют, что у *T. versutus* Na⁺-транслоцирующая СО и флагеллярный мотор Na⁺-типа работают в режиме натриевого энергетического цикла. Высокое значение дельта- σ помогает объяснить, как натронофильные бактерии не только избегают депрессии вследствие низкого дельта- p , но процветают и компенсируют гораздо более высокие энергетические затраты для выживания в суровых экстремальных условиях. Полученные данные могут также объяснить экологические предпочтения *T. versutus* и пролить свет на энергетическую причину приуроченности этих бактерий к узкой зоне хемоклина в содовых озерах. *Исследования поддержаны РФФИ, грант 20-04-01105.*

Литература

1. Muntyan MS, Cherepanov DA, Malinen AM et al. (2015). *Proc Natl Acad Sci USA* **112**:7695.
2. Мунтян МС, Морозов ДА, Клишин СС и др. (2012). *Биохимия* **77**(8):1113.
3. Muntyan MS, Viryasov MB, Sorokin DY, Skulachev VP (2022). *Int J Mol Sci*, **23**(4):1965.

СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ VPg ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ Y И ФАКТОРОВ СЕМЕЙСТВА eIF4E КАРТОФЕЛЯ

О.С. Никонов¹, М.В. Лебедева², Е.Ю. Никонова¹, В.В. Колесникова¹, В.В. Таранов², А.В. Бабаков², С.В. Никонов¹

¹Институт белка РАН, лаборатория структурных исследований аппарата трансляции, Пушкино;

²ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН, Москва

Потивирусы – самая многочисленная и вредоносная группа вирусов растений. Одним из наиболее экономически значимых вирусов является вирус картофеля Y (PVY). Наибольший ущерб он наносит картофелю, вызывая потери урожая до 80%. Кроме картофеля вирусы этого вида поражают и другие значимые сельскохозяйственные культуры. Традиционно применяемые в сельском хозяйстве методы защиты растений неэффективны в случае вирусных заболеваний. Наиболее перспективным методом является получение вирусостойчивых сортов, однако, ввиду особенностей размножения картофеля их получение традиционной селекцией затруднительно, что делает актуальными подходы, основанные на генетической модификации. PVY - РНК(+) вирус, биосинтез белка которого осуществляется по кэп-зависимому механизму с использованием элементов системы инициации трансляции клетки хозяина. Роль кэп-структуры играет вирусный белок VPg, ковалентно связанный с 5'-концом вирусной мРНК. Было показано, что один из наиболее распространенных механизмов устойчивости растений к вирусу Y связан с этапом инициации трансляции вирусной РНК в клетке хозяина, а именно - со взаимодействием белка VPg с кэп-связывающими факторами семейства eIF4E. В геноме картофеля мультисемейство факторов eIF4E представлено тремя генами – eIF4E1, eIF4E2 и eIF(iso)4E. До настоящего времени было неизвестно, с какими факторами мультисемейства и каким образом связывается вирусный белок. Мы показали, что VPg штамма NTN взаимодействует с eIF4E1 и eIF4E2, но не взаимодействует с eIF(iso)4E. Были сконструированы модели белков eIF4E1 и eIF4E2 картофеля и VPg PVY, на основании которых с использованием данных о природном полиморфизме аминокислотных последовательностей VPg было выдвинуто предположение о ключевой роли остатка R104 в узнавании кэп-связывающих факторов картофеля. Получены мутантные формы VPg с заменами в этом положении и проверена их способность связываться с eIF4E картофеля. Построена теоретическая модель комплекса VPg с eIF4E2. Предложенная модель существенно отличается от известных ранее моделей комплексов VPg вируса Y с eIF4E и хорошо соответствует имеющимся биохимическим данным. *Работа выполнена в рамках Госзадания: АААА-А19-119122490038-8 «Разработка алгоритма направленного изменения сродства биологически значимых белков к их молекулярным партнерам».*

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА eIF4E КАРТОФЕЛЯ В ПРЕПАРАТИВНЫХ КОЛИЧЕСТВАХ ДЛЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Е.Ю. Никонова, В.В. Колесникова, О.С. Никонов

Институт белка РАН, лаборатория структурных исследований аппарата трансляции, Пушкино

Борьба с вирусными заболеваниями представляет собой один из наиболее острых вопросов современного сельского хозяйства. Против вирусов не существует эффективных химических методов борьбы, которые широко применяются при заболеваниях растений, вызываемых фитопатогенными грибами и бактериями. Наиболее перспективным способом борьбы с вирусными заболеваниями сельскохозяйственных культур является создание устойчивых сортов. Вирус картофеля Y (PVY) принадлежит роду потивирусов. Болезни, вызванной этим вирусом, подвержено более 30 семейств растений, в том числе пасленовые, амарантовые, бобовые, маревые, астровые и т.д. Наибольший ущерб этот вирус наносит при культивировании картофеля (потери урожая до 80%). Так как картофель размножают вегетативно, происходит прогрессирующее накопление вируса в посадочном материале, что обычно не наблюдается для культур, размножаемых семенами. Наиболее перспективным методом получения сортов картофеля, не восприимчивых к вирусным инфекциям, вызываемым PVY, является непосредственное редактирование генов. PVY - РНК(+) вирус, несущий на 5'-конце ковалентно-связанный белок VPg, выполняющий роль кэп-структуры. Способность белка VPg связываться с eIF4E клетки хозяина является одной из ключевых детерминант восприимчивости растений к вирусу PVY. Молекулярный механизм, лежащий в основе такого типа устойчивости, изучен недостаточно. Для картофеля вообще отсутствует структурная информация по eIF4E (который представлен 4 изоформами: eIF4E1, eIF4E2, eIF(iso)4E и eIF4EHP), а для белка VPg PVY известна только одна структура белка в свободном состоянии. Простой перебор мутаций по аналогии с известными аминокислотными заменами в eIF4E, вызывающих устойчивость к PVY у других растений, не приводит к положительным результатам. Для осознанного создания мутантных форм eIF4E картофеля, не способных образовать стабильный комплекс с VPg PVY, но сохраняющих свою функциональную ак-

тивность в клетке, необходимо знать структуры соответствующих белков и их комплексов на атомарном уровне. В связи с этим нами были разработаны методики выделения рекомбинантных белков семейства EIF4E *Solanum tuberosum*. Все изоформы получены в препаративных количествах для структурно-функциональных исследований.

Работа выполнена в рамках Госзадания: АААА-А19-119122490038-8.

МЕЖКЛЕТОЧНАЯ КОММУНИКАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ ОПОСРЕДОВАНА ТРАНСКРИПЦИОННЫМИ ФАКТОРАМИ: Pdr1p и Pdr3p — АКТИВАТОРАМИ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

Е.О. Носкова¹, Д.А. Кнорре^{1,2}, К.В. Галкина^{1,2} ¹Факультет биоинженерии и биоинформатики и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) опосредована работой ABC-переносчиков с широкой субстратной специфичностью, локализованных в цитоплазматической мембране. Эти переносчики активно выбрасывают чужеродные вещества (ксенобиотики) из клетки в окружающую среду. Основным ABC-переносчиком дрожжей *S. cerevisiae* является белок Pdr5. Известно, что при попадании ксенобиотиков в клетку происходит активация транскрипционных факторов Pdr1 и Pdr3, которые стимулируют экспрессию генов ABC-переносчиков. Кроме чужеродных соединений субстратами ABC-переносчиков с широкой субстратной специфичностью могут быть интермедиаты биосинтетических путей клетки. На основании этих наблюдений мы предположили, что ABC-переносчики могут обеспечивать дрожжам межклеточную коммуникацию дрожжей в условиях стресса, вызванного ксенобиотиками: передавать “сигнал тревоги” внутри колонии и стимулировать активацию МЛУ в соседних клетках, которые еще не подверглись стрессу. Для проверки данной гипотезы мы разработали систему совместной инкубации клеток *S. cerevisiae* с активированной системой МЛУ (клетки доноры) с клетками, чья система МЛУ была изначально неактивна (клетки реципиенты). В качестве доноров с активной системой МЛУ мы использовали штаммы дрожжей без митохондриальной ДНК (Rho0) и клетки с делецией гена супрессора МЛУ RDR1. В качестве контроля мы использовали клетки-доноры с инактивированной МЛУ $\Delta pdr1\Delta pdr3$. Активность системы МЛУ в клетках мы оценивали по уровню накопления в клетках флуоресцентного субстрата ABC-переносчиков Нильского красного. С помощью флуоресцентной микроскопии мы оценили количество ABC-переносчика Pdr5-GFP в мембране клеток-реципиентов после их совместной инкубации с клетками-донорами. Совместная инкубация клеток-реципиентов с клетками-донорами с активной системой МЛУ приводила к увеличению количества Pdr5-GFP в мембране клеток-реципиентов. В то же время, совместная инкубация клеток-реципиентов со штаммом донором $\Delta pdr1\Delta pdr3$ не приводила к подобному эффекту. Таким образом, наши данные указывают на то, что клетки с активной системой МЛУ способны активировать МЛУ в соседних клетках.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-24-00406.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЕД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

Г.А. Олейник¹, С.В. Баранова¹, П.В. Жданова¹, А.А. Чернонос¹, В.В. Коваль^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины; ²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск

В ходе эволюции под воздействием различных природных факторов живые организмы адаптируются к условиям окружающей среды. Одним из таких факторов является температура, которая может понижаться ниже 5 °С. Низкая температура приводит к образованию и росту кристаллов льда, которые способны привести к гибели клеток. Тем не менее, даже в низкотемпературных климатических зонах существуют организмы, способные выживать в холодных условиях, благодаря свойствам содержащихся в них лед-связывающих белков. Эти белки обладают способностью снижать температуру замерзания воды, связываясь с кристаллами льда, что приводит к ингибированию дальнейшего образования льда. Такие свойства лед-связывающих белков можно использовать во благо людей, например, в пищевой индустрии для сохранения свойств продуктов при замораживании, в криобиологии в качестве криопротекторов для сохранения различных живых объектов от клеток крови до донорских органов и эмбрионов. Для использования свойств лед-связывающих белков в какой-либо технологии, необходимо сначала изучить и понять механизм их действия. Поскольку свойства белков в первую очередь связаны с их структурой, требуется изучение конформаций белков, как в свободном состоянии, так и в виде их комплексов. Так как структура большинства лед-связывающих белков не установлена, то целью данной работы было изучение строения лед-связывающих белков, как экспериментальными методами, так и методом молекулярного моделирования.

Исследование было поддержано проектом базового бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН № 0245-2021-0002 и грантом Минобрнауки России № 075-15-2022-263.

РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ СКРИНИНГА АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *PICNIA PASTORIS*

С.О. Пипия¹, Н.З. Мирзоева¹, Ю.А. Мокрушина^{1,2}, А.Г. Габибов^{1,2}, И.В. Смирнов^{1,3}, С.С. Терехов^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова;

³НМИЦ эндокринологии МЗ РФ, Москва

В настоящее время перед мировым сообществом остро стоит проблема лавинообразного распространения штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Таким образом, актуальной задачей является разработка новых подходов к поиску альтернативных противомикробных препаратов. Создание новых антибиотиков на основе антимикробных пептидов (АМП) является перспективным направлением, поскольку механизм их действия зачастую направлен на разрушение бактериальной мембраны, что в свою очередь характеризуется чрезвычайно низким уровнем возникновения резистентности. Химический синтез является широко распространенным способом получения АМП, однако не универсален и трудно совместим с ультравысокопроизводительными технологиями скрининга новых АМП. Альтернативным вариантом служит

биотехнологическое получение АМП в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*. Их использование имеет ряд преимуществ, таких как быстрый прирост биомассы, высокие выходы рекомбинантных белков, множество вариантов посттрансляционных модификаций и относительно низкая стоимость необходимых компонентов. В данной работе экспрессия генов АМП в дрожжах *P. pastoris* контролировалась конститутивным промотором глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAP). Конститутивная продукция панели АМП позволила детектировать ингибирование роста репортерного штамма *Escherichia coli* непосредственно рекомбинантными штаммами дрожжей. Подобная система позволит проводить широкомасштабные скрининги антимикробной активности с помощью ультравысокопроизводительных платформ и потенциально может стать важным инструментом для поиска новых антимикробных соединений.

Работа поддержана грантом 21-14-00357 Российского научного фонда.

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ G-БЕЛОК СОПРЯЖЕННОГО РЕЦЕПТОРА, АССОЦИИРОВАННОГО С ПАТОГЕНЕЗОМ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Н.А. Сафронова¹, О.А. Сухачёва¹, А.В. Мишин¹, В.Г. Черезов^{1,2}

¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия; ²University of Southern California, Los Angeles, USA

Рецепторы, сопряженные с G белком (G protein-coupled receptors, GPCR) – большое семейство, включающее в себя около 800 белков. Рецепторы класса GPCR – важные мишени для лекарственных препаратов, так как вовлечены в огромное количество физиологических процессов и связываются с разными классами химических соединений – от малых молекул до пептидов и белков. В данной работе исследуется один из GPCR-рецепторов, филогенетически близкий к цистеинил-лейкотриеновым и к пуриновым рецепторам. Этот рецептор играет важную роль в развитии ЦНС, в частности, является регулятором формирования миелиновой оболочки нейронов. Рецептор экспрессируется в клетках-предшественниках олигодендроцитов; экспрессия рецептора прекращается с началом формирования миелина. Искусственная устойчивая экспрессия рассматриваемого рецептора у мышей приводит к нарушению формирования миелина и к симптомам, схожим с симптомами рассеянного склероза. Рассматриваемый рецептор также играет определенную роль при различных повреждениях ЦНС, в частности, при травмах и ишемических повреждениях. Есть данные, что ингибирование этого рецептора уменьшает повреждение при моделировании ишемии у крыс. Всё вышесказанное делает описываемый рецептор привлекательной мишенью для разработки новых лекарственных препаратов. Особенно актуальна задача поиска селективных и эффективных ингибиторов для этого рецептора, обладающих минимальными побочными эффектами. Структура рецептора высокого разрешения поможет решить эту задачу. Для получения структуры рецептора необходимо наработать рецептор в достаточных количествах, а также добиться того, чтобы очищенный белок был достаточно стабильным и мономерным. В данной работе мы создали генно-инженерные конструкции рецептора для экспрессии в клетках насекомых Sf9. Конструкции и протокол очистки рецептора были оптимизированы для получения наибольшего выхода белка и его наилучшей стабильности. В итоге был получен мономерный образец данного рецептора в мицеллах из детергента, проведены попытки кристаллизации. Также был получен мономерный образец рецептора в комплексе с G белками для исследований методом криоэлектронной микроскопии. *Работа была выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект 22-74-10036.*

ТЕХНОЛОГИИ КАПЕЛЬНОЙ МИКРОФЛЮИДИКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ И ПОИСКА УНИКАЛЬНЫХ ФЕНОТИПОВ

С.С. Терехов¹, А.Г. Габибов^{1,2}, И.В. Смирнов^{1,2} ¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Микрофлюидные технологии произвели революцию в области исследования живых систем. Миниатюризация и использование принципов компартиментализации позволили перейти к анализу индивидуальных клеток, их геномов и транскриптомов. Детальный фенотипический анализ индивидуальных клеток представляет особый интерес, так как позволяет идентифицировать новые биомолекулы, обладающие уникальной активностью, а также межмолекулярные и межклеточные взаимодействия. Мы разработали ряд технологий, основанных на микрофлюидной компартиментализации индивидуальных клеток, которые позволяют не только осуществлять детальный высокопроизводительный анализ, но и отбор целевых популяций по их фенотипу, позволяя реализовать глубокое фенотипическое и генотипическое профилирование биоразнообразия. Применяя принципы компартиментализации к разнообразным биологическим объектам, мы показали, что они не только позволяют наиболее эффективно сохранить биоразнообразие, но также являются незаменимым инструментом для поиска уникальных представителей с заданной функциональностью. Ввиду своей универсальности, данная концепция была эффективно использована для глубокого функционального профилирования природного и синтетического биоразнообразия. Инкапсулируя индивидуальные клетки в каплях эмульсии, нами была проведена направленная эволюция ферментов, поиск антибиотиков и пробиотиков, персонализированный скрининг антибиотикорезистентности, а также реконструкция природного репертуара антител человека. Технологические платформы, основанные на принципах компартиментализации и ультравысокопроизводительного скрининга, позволяют перейти на новый уровень понимания функционирования живых систем.

Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ 19-14-00331-П.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ В РЕАКЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ЦИТОТОКСИНОВ

Н.С. Юдина, Т.Н. Герт, В.А. Мясников, Е.Г. Кручинин

Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины МО РФ, Санкт-Петербург

Особенностью ряда цитотоксинов, таких как экзотоксин А синегнойной палочки, дифтерийный токсин (Dtx) и др., используемых при создании противоопухолевых препаратов, выступает необходимость применения их активированных форм.

Активация, к примеру, Dtx заключается в удалении N-концевого пептида у ферментоактивного фрагмента А по сайту R190 и/или R193 действием трипсина и последующим торможением реакции белком-ингибитором трипсина из соевых бобов (ITrA). На примере активации Dtx были исследованы альтернативные ингибиторы аргинин-специфичных сериновых протеаз: мезилаты нафамостата (CAS8296-11-4) и камостата (CAS59721-29-8). Механизм инактивации трипсина нафамостатом и камостатом состоит в слабо обратимом присоединении к ферментам по серину 4-гуанидинбензойной кислоты. Оценка ингибирующих свойств химических соединений по отношению к трипсину проведена в сравнении с ITrA и при отсутствии ингибиторов методом гель-электрофореза (ДСН-ПААГЭ). Показано, что после внесения всех использованных ингибиторов дальнейший протеолиз активированного Dtx в присутствии трипсина в течение 24 ч при 37 °С не происходит. Требуемая степень протеолиза Dtx подтверждена методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР), и ДСН-ПААГЭ. Таким образом, ингибирующая способность исследованных химических соединений равноценна ITrA, при этом они легко удаляются методом фильтрации, а также, в отличие от ITrA, не оказывают влияния на клетки печени и нейтрофильную эластазу. Важно отметить низкую токсичность изученных низкомолекулярных ингибиторов, которая находится на уровне от 0,1 до 10 г/кг.

СРАВНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ПРЕПАРАТАМИ НА ОСНОВЕ ЛАКТАПИНА И ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЕННОЙ СТРУИ

О.С. Троицкая¹, Д.Д. Новак^{1,2}, М.Е. Варламов¹, М.М. Бирюков^{1,2}, В.А. Рихтер¹, Д.Э. Закревский³, И.В. Швейгер⁴, О.А. Коваль^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет; ³Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН; ⁴Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН, Новосибирск

В настоящее время поиск противоопухолевых агентов, вызывающих гибель раковых клеток и активирующих противоопухолевую иммунную реакцию, является актуальной задачей. Поглощение погибающих клеток фагоцитирующими клетками важно для предотвращения воспаления и формирования долгосрочного противоопухолевого ответа. Ранее было показано, что рекомбинантный аналог лактапина RL2, вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующий ГМ-КСФ человека и лактапин, и холодная плазменная струя (ХПС) вызывают гибель опухолевых клеток с признаками иммуногенной гибели (ICD) *in vitro*. В данной работе мы сравнивали иммунологические эффекты опухолевых клеток, обработанных препаратами на основе лактапина и ХПС. Для экспериментов с ХПС использовали режим облучения клеток, при котором жизнеспособность снижалась на 50% через 24 ч (гелий, $v=9$ л/мин, $U=4.9$ кВ). RL2 и вирус VV-GMCSF-Lact использовали в концентрациях, соответствующих IC50. В качестве опухолевой модели использовали клетки рабдомиосаркомы MX-7, сингенные для мышей С3Н. Мы показали, что инкубация клеток MX-7 с RL2 и VV-GMCSF-Lact вела к увеличению концентрации ИФН α в культуральной среде, что свидетельствовало о выходе ИФН α под воздействием индукторов. Эффективность фагоцитоза дендритными клетками красного костного мозга (ДК) клеток MX-7, обработанных индукторами ICD, оценивали методом проточной цитометрии. Было показано, что популяция ДК, захвативших клетки MX-7, обработанные RL2, составила около 30%. В образцах, обработанных VV-GMCSF-Lact и ХПС, доля фагоцитирующих клеток была ниже. Способность погибающих клеток MX-7 активировать незрелые ДК оценивали по появлению молекулы МНС II на поверхности ДК. При оценке созревания ДК было показано, что в образцах с RL2 доля МНС II $^{+}$ -клеток составила около 22%, в образцах, облученных ХПС – около 12%, а в образцах с вирусом не отличалась от контроля. Захват гибнущих клеток MX-7 CD11c $^{+}$ -клетками селезенки *in vivo* был детектирован только у мышей, получавших инъекции RL2-обработанных клеток. Таким образом, среди исследуемых индукторов именно RL2 вызывает наиболее существенные изменения, характерные для индукции ICD. Возможно, модификация режима облучения клеток ХПС позволит усилить активацию иммунной системы для формирования противоопухолевого иммунитета. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-19-00255-П.

НЕКОТОРЫЕ БЕЛКИ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ ВЛИЯЮТ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Н.Д. Федорова¹, Д.А. Сумбатян¹, А.В. Соколов², Е.Ю. Варфоломеева¹

¹НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина; ²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

Нейтрофилы являются ключевыми игроками врожденной иммунной системы, ее первой линией защиты. Различные инфекционные частицы разрушаются нейтрофилами посредством фагоцитоза и последующего каскада реакций, в частности, реакции респираторного взрыва (РРВ). Нейтрофилы генерируют активные формы кислорода (АФК) во время РРВ и используют их для уничтожения захваченных агентов. Крайне важно строго регулировать такой процесс из-за повреждающего воздействия перепроизводства АФК на окружающие ткани. Исследование, проведенное в НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ [1], показало, что необходимое для нормального течения беременности снижение функциональных свойств нейтрофилов связано с увеличением концентрации белка острой фазы церулоплазмينا в несколько раз по сравнению со здоровыми небеременными донорами. Основываясь на данных этого исследования, было высказано предположение, что другие белки острой фазы воспаления (БОФ) также могут быть вовлечены в модификацию функциональной активности нейтрофилов. В более позднем нашем исследовании было показано влияние фибриногена на РРВ нейтрофилов периферической крови [2]. В этой работе впервые было исследовано влияние некоторых белков острой фазы (а именно, С-реактивного белка (CRP), сывороточного амилоида А (SAA) и альфа-1-кислого гликопротеина ($\alpha 1AGP$)) на способность нейтрофилов периферической крови к РРВ. Было показано, что они могут приводить как к увеличению, так и к снижению их способности продуцировать АФК. Интенсивность реакции респираторного взрыва (РРВ) измеряли с использованием оригинальной методики проточной цитометрии, описанной в [3]. Кроме того, было визуализировано взаимодействие церулоплазмينا и фибриногена с нейтрофилами на мембране последних с использованием конфокальной микроскопии.

Литература

1. Varfolomeeva EY et al. Ceruloplasmin decreases respiratory burst reaction during pregnancy. 2016. *Free Radic Res.* Vol. 50(8), pp. 909-19.
2. Федорова Н.Д. и др. Вирусные инфекции влияют на функциональную активность нейтрофилов периферической крови. *Актуальные вопросы биологической физики и химии.* 2021. 6(1). с. 115-123.
3. Filatov M., Varfolomeeva E., Ivanov E. Flow cytofluorometric detection of inflammatory processes by measuring respiratory burst reaction of peripheral blood neutrophils. *Biochem. Mol. Med.* 1995.55(2):116-121.

ТАРГЕТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ МУТАНТНОГО P53

Э.М. Хусаинова¹, Д.Р. Давлетшин¹, В.В. Часов¹, Р.Р. Хадиуллина¹, М. Бауд², Э.Р. Булатов^{1,3}

¹Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, Казань; ²Университет Саутгемптона, Великобритания; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Изучение роли онкосупрессоров в опухолевых трансформациях и в гибели опухолевых клеток является важным аспектом во многих областях биохимии и онкологии. Одним из самых известных онкосупрессоров является продукт гена TP53 – белок p53. Этот белок активируется в ответ на различные виды клеточного стресса и является ключевым фактором в защите клетки от онкотрансформации. Функция белка p53 заключается в регуляции экспрессии генов, продукты которых приводят к остановке клеточного цикла и апоптозу. Многие виды онкологических заболеваний связаны с инактивацией опухолевого супрессора p53 в результате миссенс-мутаций. Онкогенная мутация p53Y220C является девятой по распространенности мутацией p53. Она создает расширенный поверхностный карман в ДНК-связывающем домене, что дестабилизирует p53 и вызывает денатурацию и агрегацию. В связи с этим актуальной является разработка таргетных препаратов для модуляции активности p53Y220C. Целью работы является оценка эффективности производных (1H-пиррол-1-ил)индазола в качестве модуляторов активности мутантного p53Y220C. В работе использовали следующие клеточные линии рака молочной железы человека (MCF7 p53wt, MCF7 p53-/-, MCF7 p53Y220C) и гепатокарциномы человека (HUN7 p53Y220C). Вестерн-блот анализ проводили для исследования влияния производных индазола на экспрессию белка p53. Иммуноцитохимический анализ проводили с целью оценки способности исследуемых соединений к индукции рефолдинга мутантного p53Y220C. По результатам вестерн-блот анализа выявлено, что соединения приводят к повышению экспрессии белка p53 в клеточных линиях с p53Y220C. Иммуноцитохимический анализ обработанной клеточной линии HUN7 p53Y220C показал способность исследуемых соединений к индукции рефолдинга мутантного p53Y220C с приобретением им конформации, соответствующей белку дикого типа, и увеличению количества белка в клетке. Таким образом, результаты показали, что производные индазола оказывают специфическое действие на клетки, несущие мутацию p53Y220C, и стабилизируют мутантный белок в конформации, близкой к белку дикого типа. Работа выполнена за счет средств гранта РФФИ 22-24-20034, при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

РОЛЬ YAP1 В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

О.Л. Черкашина, А.К. Бейлин, А.В. Косых, А.Л. Риппа, Э.С. Чермных, Е.А. Воротеляк, Е.П. Калабушева

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

YAP1 – транскрипционный коактиватор, регулирующий процессы дифференцировки и пролиферации в коже человека. Изменения в его уровне экспрессии и распределении в клетках связывают с различными патологическими состояниями, однако точные механизмы его действия изучены недостаточно подробно. Для изучения роли YAP-сигналинга в процессе дифференцировки кератиноцитов использовали разработанную в нашей лаборатории уникальную модель ксенотрансплантации кожи человека мышам линии NOD/SCID, содержащую все слои дермы, эпидермис, волосяные фолликулы, сальные и потовые железы. Биопсии, полученные на 32, 40, 75 и 110 сутки после ксенотрансплантации, изучали иммуногистохимически и сравнивали со здоровой кожей, с биопсиями хронической раны и кожной папилломы, а также с данными, полученными на модели живых эквивалентов кожи. Анализ распределения маркеров и морфометрические измерения проводили в программах ImageJ и Cell Profiler, статистический анализ – в программе GraphPad Prism 8. В то время как в норме YAP1 экспрессируется в базальном слое эпидермиса и обнаруживается в единичных ядрах, на 32 сутки после ксенотрансплантации паттерн распределения схож с хронической раной – он слабо экспрессируется в эпидермисе, при этом эпидермис значительно утолщен, и отсутствует кератин 10 – маркер супрабазальных слоев эпидермиса. На 40 сутки в трансплантате начинает появляться кератин 10, так же как в одной биопсии хронической раны, однако кератиноциты, имеющие базальный фенотип, располагаются в 2-3 слоях над базальной мембраной. К 75 и 110 суткам трансплантат начинает напоминать папиллому – YAP1 транслоцируется в ядра большинства клеток базального слоя эпидермиса, но базальный фенотип также наблюдается в нескольких слоях кератиноцитов. Взаимосвязь между ядерной локализацией YAP1 и утолщением базального слоя наблюдается и в случае с кожными эквивалентами. Ядерная локализация YAP1 может быть индикатором клеток, находящихся в прогениторном состоянии. Увеличение числа клеток с активированным YAP-сигналингом может быть связано с гиперпролиферативным и гипертрофическим фенотипом, а отсутствие в эпидермисе – с нарушением нормального процесса дифференцировки. Работа поддержана грантом РФФИ № 21-74-30015.

ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПРОЛИН-БОГАТЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

А.Л. Коневга^{1,2}, О.В. Шуленина^{1,2}, Е.Б. Пичкур^{1,2}, П.В. Пантелеев³, Т.В. Овчинникова³, Е.В. Полесскова¹

¹Петербургский институт ядерной физики, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; ²НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Возникновение и распространение бактериальных штаммов, устойчивых к применяемым антибиотикам, приобретает угрожающие масштабы. Одним из вариантов решения данной проблемы является изучение молекулярного механизма действия веществ с антибактериальной активностью с целью создания новых эффективных терапевтических препаратов. На сегодняшний день пролин-богатые антимикробные пептиды (ПБАМП) являются достаточно перспективным объектом для изучения, поскольку они обладают антимикробной активностью в сочетании с низкой токсичностью по отношению к эукариотическим клеткам. ПБАМП ингибируют биосинтез белка, взаимодействуя с бактериальной рибосомой. В соответствии с данными рентгеноструктурного анализа ПБАМП связываются с выходным тоннелем рибосомы, располагая N-концевую область в пептидилтрансферазном центре рибосомы. Такая локализация пептида может препятствовать корректному расположению обеих тРНК и прохождению пептидилтрансферазной реакции. Однако данных, раскрывающих детали механизма ингибирования бактериального синтеза ПБАМП, пока нет.

В данной работе проведен систематический функциональный анализ ингибиторных свойств ПБАМП подотряда жвачных в отношении парциальных реакций бактериального биосинтеза белка. Для изучения роли N-концевой области ПБАМП в работе использовались несколько вариантов пептида с deletированными участками. Для определения структурных основ ингибиторного действия ПБАМП была получена криоэлектронная структура пептида, связанного с функциональным мРНК-содержащим инициаторным рибосомным комплексом. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00278).

АРХЕЙНЫЕ И БАКТЕРИАЛЬНЫЕ РНК-ШАПЕРОНЫ СЕМЕЙСТВА LSM: ОДИНАКОВЫЕ СТРУКТУРЫ, РАЗНЫЕ СВОЙСТВА

А. Никулин, Н. Леконцева, А. Михайлина, М. Фандо, С. Тищенко

Институт белка РАН, Пушино

В регуляции экспрессии генов в бактериях важную роль играют малые регуляторные РНК (мРНК). Взаимодействуя с мРНК, они влияют на её стабильность и модулируют процесс трансляции. Взаимодействию регуляторных мРНК с комплементарными участками мРНК способствуют белки, называемые РНК-шаперонами. Наиболее универсальным представителем этого класса является белок Hfq, который не только способствует взаимодействию транс-мРНК с мРНК, но и участвует в процессе полиаденилирования 3'-конца мРНК, регулируя таким образом её время жизни в бактериальных клетках. Белок Hfq чрезвычайно консервативный по своей структуре и представляет собой β-бачонок из пяти тяжелей с N-концевой α-спиралью. Hfq формирует высокостабильную тороидальную четвертичную структуру из шести мономеров. На двух противоположных сторонах этого тора находятся уридин- и аденин-специфические участки связывания РНК, которые, как считается, связывают мРНК и мРНК соответственно. Кроме того, еще один РНК-связывающий участок белка расположен на боковой поверхности гексамера. Он считается местом встречи и формирования дуплекса связанных белком мРНК и мРНК. В археях и эукариотах имеются структурные гомологи белка Hfq. Они обладают РНК-связывающими свойствами и также формируют мультимеры, но из семи мономеров. Эукариотические белки являются в основном каркасными белками и участвуют в формировании мРНК, а функция архейных белков до конца не выяснена. Наши работы по исследованию структур и РНК-связывающих свойств архейных гомологов белка Hfq, называемых SmAP, позволили определить, что такие белки имеют только один, уридин-специфический участок связывания РНК. Структурный аналог аденин-специфического РНК-связывающего участка SmAP белков имеет кардинальные изменения, что приводит к потере его функциональности. Это подтверждается незначительным сродством SmAP белков к олиго(А) РНК. Однако SmAP сохраняют способность разрушать вторичную структуру РНК. Мы предполагаем, что архейные белки SmAP не могут выполнять функцию РНК-шаперонов, но могут участвовать в регуляции экспрессии генов по другим механизмам, а также принимать участие в созревании РНК.

ИЗУЧЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И АНТИФАГОВОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКА-АРГОНАВТА ИЗ МЕЗОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *EXIGUOBACTERIUM MARINUM*

В.А. Пантелеев, М.А. Простова, Е.В. Кропачева, А.В. Кульбачинский, Д.М. Есюнина

НИЦ «Курчатовский институт» – Институт молекулярной генетики, Москва

Белки-аргонавты – эндонуклеазы, использующие гидовые нуклеиновые кислоты для поиска и расщепления нуклеиновых кислот-мишеней. Вопросы, связанные с функциями аргонавтов в прокариотической клетке, остаются открытыми. Доказано, что некоторые аргонавты защищают бактерий от вирусов. В данном исследовании мы охарактеризовали особенности ферментативной активности аргонавта из мезофильной бактерии *Exiguobacterium marinum* (EmaAgo) *in vitro* и изучили его влияние на протекание инфекции бактериофага P1 в системе *Escherichia coli*. Будучи загруженным коротким однонитевым ДНК гидом, EmaAgo способен расщеплять комплементарную одонитевую ДНК-мишень. В *in vitro* экспериментах было проведено исследование влияния различных параметров реакции (рН, температура, ионная сила и доступность разных катионов металлов) на расщепление одноцепочечной мишени аргонавтом. Изучена способность аргонавта к разрезанию двуцепочечной ДНК-мишени в различных условиях. Для исследования влияния аргонавта на протекание фаговой инфекции клетки *E.*

coli, экспрессирующие аргонавт EmaAgo, были заражены бактериофагом P1. Эффект аргонавта на протекание инфекции оценивали с помощью построения кривых роста, измерения титра вирусных частиц, количества вирусной ДНК методом количественной ПЦР. Показана повышенная выживаемость клеток, экспрессирующих аргонавт, при инфекции бактериофага P1, снижение продукции фаговых частиц и уменьшение количества вирусной ДНК в бактериях. Проведенная работа показывает, что белки-аргонавты способны подавлять репликативный цикл бактериофагов, вероятно, расщепляя их геномную ДНК. Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-15-2021-1062).

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИРОДНЫХ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ФЕРМЕНТОВ ЧЕЛОВЕКА, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК

И.В. Алексеева, О.А. Кладова, А.Т. Давлетгильдеева, А.С. Бакман, Н.А. Кузнецов, О.С. Федорова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Процесс эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER) является одним из основных путей противодействия генотоксическим эффектам необъемных повреждений ДНК, которые ежедневно возникают в клеточном геноме. Участниками пути BER выступают ограниченное число ферментов, а именно ДНК-гликозилаза, специфичная к конкретному типу повреждения, AP-эндонуклеаза, ДНК-полимераза и ДНК-лигаза. На сегодняшний день известно, что в популяции людей присутствует большое количество полиморфных вариантов (SNP) данных ферментов. Литературные данные свидетельствуют о том, что аминокислотные замены, вызванные SNP, могут приводить не только к ухудшению функциональной активности конкретного фермента, но и быть причиной нарушения белок-белковых взаимодействий с другими участниками BER, что приводит к снижению эффективности процесса репарации ДНК. Установлено, что некоторые SNP ассоциированы с развитием различных заболеваний, от нейродегенеративных до онкологических. Цель данной работы состояла в экспериментальном определении влияния некоторых аминокислотных замен, вызванных SNP, на активность ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4, а также AP-эндонуклеазы APE1 человека. Для этого методом сайт-направленного мутагенеза были получены четыре полиморфных варианта ДНК-гликозилаз SMUG1 (G90C, P240H, N244S, N248Y) и MBD4 (S470L, G507S, R512W, H557D), а также семь полиморфных вариантов APE1 (R221C, N222H, R237A, G241R, M270T, R274Q, P311S). Для прямой регистрации скорости накопления продуктов превращения ДНК-субстратов использовали метод гель-электрофореза в полиакриламидном геле. Стадии образования фермент-субстратных комплексов и катализа были проанализированы методом «остановленного потока», что позволило зарегистрировать конформационные превращения в молекулах ферментов и модельных ДНК-субстратах. Была определена способность ряда ферментов репарации ДНК человека (ДНК-гликозилазы OGG1, UNG2 и AAG; ДНК-полимераза β ; или вспомогательных белков XRCC1 и PCNA) влиять на активность APE1 дикого типа и его природных полиморфных вариантов. Использование данных подходов позволило определить влияние выбранных аминокислотных замен не только на самостоятельное функционирование ферментов, но и установить их роль в белок-белковых взаимодействиях. Работа выполнялась при поддержке гранта РФ № 21-14-00018.

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ ДНК НА НУКЛЕАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ-АРГОНАВТОВ

М.А. Бескровная, А.А. Агапов, Д.М. Есюнина, А.В. Кульбачинский

Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия

Белки-аргонавты - металл-зависимые эндонуклеазы, использующие короткие гидовые олигонуклеотиды для внесения одноцепочечных разрывов в ДНК или РНК, комплементарную этим гидам. Их можно обнаружить практически у всех эукариот, а также у 10-20% архей и прокариот. Эукариотические белки-аргонавты хорошо изучены и используют РНК-гид для узнавания и разрезания РНК-мишени. Механизм работы и функции прокариотических аргонавтов активно исследуются в настоящее время. Большинство исследованных активных белков-аргонавтов прокариот используют ДНК-гиды для расщепления ДНК-мишеней. Было показано, что некоторые из них принимают участие в защите бактерий от чужеродной ДНК (фагов и плазмид). Способность использовать гидовые олигонуклеотиды для специфического расщепления ДНК-мишеней делает аргонавты потенциально интересными с точки зрения поиска новых генно-инженерных инструментов. Во всех ранее опубликованных исследованиях *in vitro* изучалось расщепление немодифицированных мишеней, однако в клеточной ДНК встречаются поврежденные и модифицированные нуклеотиды. Изучение влияния модификаций ДНК-мишени на нуклеазную активность прокариотических аргонавтов важно для их применения в качестве программируемых нуклеаз. Изучено влияние 5 различных модификаций ДНК (Об-метилгуанин, 8-оксогуанин, 1,N6-этноаденин, тимингликоль, тиминовые димеры) на нуклеазную активность 3 белков-аргонавтов мезофильных бактерий: *Kurthia massiliensis* (KmAgo), *Clostridium butyricum* (CbAgo), *Dorea longicatena* (DloAgo). Показано, что эффективность расщепления мишени зависит от расположения данных модификаций относительно сайта разрезания. Влияние модификаций усиливается по мере их приближения к сайту разрезания. Это может происходить из-за нарушения комплементарных взаимодействий между гидом и мишенью и/или изменения конформации мишени в сайте разрезания. Исключением являлся Об-метилгуанин, в присутствии которого не было замечено сильных изменений в нуклеазной активности исследованных белков-аргонавтов. Чувствительность белков-аргонавтов к повреждениям в ДНК может быть использована для разработки новых методов детекции модификаций в определенных положениях мишени, за счет преимущественной элиминации немодифицированной ДНК. Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение 075-15-2021-1062).

ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ШАЙНА–ДАЛЬГАРНО НА СТАДИЮ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Л.О. Шамардина^{1,2}, Д.С. Виноградова^{1,3}, П.С. Касацкий¹, Е.В. Полесскова^{1,2}, А.Л. Конева^{1,2,4}

¹Петербургский институт ядерной физики, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; ³Нанотемпер Технологис Рус, Санкт-Петербург;

⁴НИЦ «Курчатовский институт», Москва

За связывание матричной РНК (мРНК) с малой 30S субъединицей рибосомы на этапе формирования инициаторного комплекса отвечает нуклеотидная последовательность в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО), называемая Шайна–Дальгарно (ШД). Само по себе наличие данной последовательности не является строго необходимым условием для сборки 70S инициаторного комплекса (70S IC), в пользу чего говорит существование безлидерных мРНК с отсутствующей 5'-НТО, а также процесс реинициации [1, 2]. Однако, изменения в 5'-НТО мРНК могут кардинальным образом влиять на стадию инициации [3]. В представленной работе мы оценивали эффективность вступления 70S IC, содержащего мРНК с различиями в последовательности ШД, в стадию элонгации для последующего синтеза полипептидной цепи. Наши результаты показывают, что кинетика связывания элонгаторной транспортной РНК (тРНК), несущей следующую аминокислоту для построения пептидной цепи в А сайт рибосомы, не зависит от связанной мРНК в 70S IC. Однако, не все такие инициаторные комплексы способны связывать тРНК, вероятно, в результате значительных конформационных изменений рибосомы или ее лигандов. Кроме того, эффективность синтеза дипептида зависела от изменений в последовательности ШД.

Литература

1. Gualerzi C., Pon C. Initiation of mRNA translation in bacteria: structural and dynamic aspects // Cell. – 2015. – vol. 72. – p. 4341–4367
2. Milón P., Rodnina M. V. Kinetic control of translation initiation in bacteria // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology – 2012. – vol. 47. – p. 334–348
3. Vinogradova D.S., Zegarra V., Maksimova E., Nakamoto J.A., Kasatsky P., Paleskava A., Konevega A.L., Milón P. How the initiating ribosome copes with ppGpp to translate mRNAs // PLoS Biol. – 2020. – vol. 18(1). – e3000593

ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКА ТЕРМОРУБИНА НА ЭТАПЫ ЦИКЛА ЭЛОНГАЦИИ СИНТЕЗА БЕЛКА ПРОКАРИОТ

А.А. Грачев^{1,2}, О.А. Голичева¹, Е.В. Полесскова^{1,2}, А.Л. Конева^{1,2,3}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург; ³НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Трансляция, проходящая на рибосомах с вовлечением широкого спектра белков и различных молекул РНК, является сложным многостадийным процессом. Нарушение любого из этапов синтеза может оказаться фатальным для прокариотической клетки, и поэтому система биосинтеза белка у бактерий является привлекательной мишенью для действия антибактериальных средств. Широкое и зачастую легкомысленное применение антибиотиков приводит к развитию и распространению штаммов, обладающих устойчивостью к используемым препаратам. Поэтому поиск новых природных и синтетических соединений с антибактериальной активностью, а также объяснение их механизмов действия являются одной из наиболее актуальных задач науки о жизни. Терморубин – низкомолекулярный ингибитор биосинтеза белка прокариотов, впервые выделенный более 50 лет назад. Однако его молекулярный механизм действия до сих пор не выяснен. Целью данной работы являлось изучение влияния антибиотика терморубина на скорость и эффективность парциальных реакций цикла элонгации бактериального синтеза белка. С использованием реконструированной *in vitro* системы синтеза белка *E.coli* мы показали, что терморубин не оказывает существенного влияния на количественную способность рибосом обеспечивать пептидилтрансферную реакцию. Тем не менее, добавление терморубина вызывает снижение скорости реакции связывания аминоацил-тРНК в А сайт и повышает скорость транслокации – перехода пептидил-тРНК из А сайта в Р сайт. Также мы показали, что терморубин дестабилизирует А-сайтovou пептидил-тРНК. Из построения Аррениуса следует, что терморубин уменьшает энергию активации диссоциации пептидил-тРНК из А сайта. Таким образом, предполагаемый механизм ингибирования антибиотиком терморубином непосредственно связан с дестабилизацией рибосомных комплексов в ходе синтеза пептидной цепи. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00278).

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ДНК-ДИОКСИГЕНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА АВН2 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МУТАНТНЫХ ФОРМ ФЕРМЕНТА С НОВЫМИ СВОЙСТВАМИ

А.Т. Давлетгильдеева, Т.Е. Тюгашев, Н.А. Кузнецов, О.С. Федорова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов является важным путем контроля реализации генетической информации живыми организмами. Сайт-специфическое метилирование ДНК представляет собой один из важнейших путей обеспечения данного процесса. Контроль уровня метилирования за счет удаления метильных групп из ДНК, главным образом, катализируется негемовыми Fe(II)/ α -кетоглутарат-зависимыми ДНК-диоксигеназами. Диоксигеназы семейства AlkB представляют собой ферменты репарации, которые катализируют прямое удаление алкильных групп из оснований ДНК, таких как 3-метилцитидин (3mC), 1-метиладенозин (1mA), 1,N6-этноаденозин и другие. Однако ферменты семейства AlkB (включая ферменты человека АВН2 и АВН3) способны окислять такие эпигенетические модуляторы как 5-метилцитидин (5mC), 5-гидроксиметилцитидин и др. *in vitro*. При этом переключение между анти-конформацией (3mC) и син-конформацией (5mC) может иметь ключевое значение для осуществления каталитического окисления метильных групп в активном центре фермента. В ходе данного исследования проводили ремоделирование активного центра ДНК-диоксигеназы человека АВН2 посредством внесения в него точечных мутаций для получения вариантов, обладающих свойствами, отличными от фермента

дикого типа. На основании анализа структурных данных был отобран ряд аминокислотных остатков, предположительно способных формировать водородные связи с метилированными основаниями (в том числе с 5mC) или приводить к стерическим затруднениям в процессе выворачивания модифицированного основания в активный центр фермента. Выбранные аминокислоты были заменены на аланин с помощью сайт-направленного мутагенеза. Для анализа субстратной специфичности полученных мутантных форм определяли скорость ферментативного процесса, разделяя исходные субстраты и продукты гель-электрофорезом в полиакриламидном геле. Конформационные превращения фермент-субстратного комплекса в процессе узнавания различных алкилированных нуклеотидов регистрировали по изменению интенсивности остатков триптофана в ферменте в сочетании с методом «остановленного потока». Полученные данные позволяют глубже понять механизмы распознавания модифицированных азотистых оснований ферментом АВН2 в процессе эпигенетического деметилирования ДНК. Работа выполнялась при поддержке гранта РФФ № 21-14-00018.

НОВЫЕ МИРНК-НАПРАВЛЕННЫЕ ИСКУССТВЕННЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ КРАБОПОДОБНОЙ СТРУКТУРЫ

О.А. Патутина¹, Д.А. Чиглинцева¹, Т. Хейман², Е.В. Биченкова², С.К. Гапонова¹, В.В. Власов¹, М.А. Зенкова¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Университет Манчестера, Великобритания

За последние два десятилетия лавинообразное накопление данных о функциях миРНК обозначило центральную роль этих молекул как важнейших регуляторов фундаментальных физиологических процессов. Установлено, что aberrантная экспрессия миРНК приводит к глобальной реорганизации клеточного сигналинга, вызывая патологическую трансформацию клеток и развитие целого ряда трудноизлечимых заболеваний. Перспективной стратегией снижения патологически высокого уровня определенных миРНК, наблюдаемого, в частности, при канцерогенезе, является применение сиквенса-специфических искусственных рибонуклеаз (иРНКаз). Эффективность миРНК-направленных иРНКаз – миРНКаз – впервые была показана для шпилечных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, осуществляющих расщепление миРНК в её 3'-области. В данной работе для подавления высокоонкогенных миРНК-21 и миРНК-17 были разработаны сиквенса-специфические иРНКазы нового дизайна – крабоподобные миРНКазы, состоящие из олигонуклеотида, комплементарного центральной части миРНК, и двух каталитических пептидов [(LeuAlg)2Gly]₂, присоединённых по 5'- и 3'-концам адресующего домена. Уникальность разработанных нуклеаз заключается в способности расщеплять миРНК-мишень в "5'-затравочной" и "3'-компенсаторной" областях, являющихся ключевыми детерминантами её функциональной активности. Исключительной характеристикой разработанных миРНКаз является способность расщеплять миРНК в каталитическом режиме, приводя к полной деградации двукратного избытка миРНК уже к 24 ч. Более того, установлено, что образуемый гетеродуплекс миРНК/миРНКаз представляет собой субстрат для РНКазы H, что дополнительно многократно увеличивает скорость деградации миРНК-мишени. Было установлено, что специфическое снижение уровня миРНК-21 и миРНК-17 в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF7 приводит к 50%-ному снижению пролиферативной активности опухолевых клеток и индукции апоптоза приблизительно в 20% клеточной популяции. Каталитическая природа активности крабоподобных миРНКаз, усиленная синергизмом с внутриклеточной РНКазой H, является основой для деградации множественных копий онкогенных миРНК в опухолевых клетках, приводя к подавлению патологических процессов, вызванных злокачественной трансформацией. Данная работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-14-00250.

МАДУМИЦИН II: УТОЧНЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ НА РИБОСОМНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Е.В. Полесскова¹, О.В. Шуленина^{1,2}, А.В. Якушева^{1,2}, Е.Б. Пичкур^{1,2}, А.Л. Коневега^{1,2}

¹Петербургский институт ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; ²НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Интенсивное изучение механизмов действия антибиотиков, ингибирующих работу бактериальной рибосомы, привело к формированию нового направления в данной области. Ранее считалось, что большинство канонических антибиотиков работают по принципу вкл/выкл, когда наличие антибиотика приводит к невозможности связывания одного из функциональных лигандов с рибосомным комплексом или ингибированию протекания одной из парциальных реакций биосинтеза белка. Однако, подобный механизм реализуется далеко не всегда и антибиотики могут обладать более селективным действием, ингибируя функционирование рибосом только в случае определенной последовательности мРНК или аминокислот в растущей полипептидной цепи.

Совокупность функциональных биохимических тестов и криоэлектронной микроскопии показала, что Маду оказывает плейотропное действие на рибосому. Связываясь с рибосомой, Маду изменяет положение акцепторного конца тРНК в Р-сайте не только в случае деацелированной, но также аминоацелированной и пептидилной формы. Однако для отгибания рибозы А76 ССА-конца Р-тРНК в случае наличия нескольких аминокислотных остатков требуется значительно более высокая концентрация антибиотика. Подобная релокация ССА-конца тРНК не позволяет тРНК принимать участие в пептидилтрансферной реакции. Помимо этого, наличие Маду в комплексе дестабилизирует тРНК в А-сайте, препятствует аккомодации ее аминокислотного остатка, ингибирует транслокацию и повышает лабильность нуклеотида U2506, имеющего важное значение для протекания пептидилтрансферной реакции.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00278).

СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ РИБОСОМЫ КВАССИНОИДАМИ

**И.И. Сорокин^{1#}, Е.Б. Пичкур^{2,3#}, Л.А. Гараева^{2,3}, А.Ю. Красота^{1,4}, Е.А. Панова^{1,5}, Д.О. Владимиров⁵, Т.А. Штам^{2,3},
А.Л. Коневга^{2,3}, С.Е. Дмитриев^{1,5*}**

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ²Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина; ³НИЦ «Курчатовский институт», Москва; ⁴ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва; ⁵Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

#Авторы внесли равный вклад в работу

Квасиноиды – низкомолекулярные соединения класса тритерпенов, синтезируемые растениями семейства Симабуровые. Препараты из этих растений применяются в традиционной восточной медицине в качестве противоопухолевых и противовоспалительных средств, для борьбы с вирусными заболеваниями и паразитами. Активными компонентами этих препаратов являются квасиноиды – айлантон, бруцеантин, эврикуманон и другие. Несмотря на задокументированные терапевтические эффекты этих соединений в отношении ряда онкологических заболеваний, их мишень в эукариотической клетке и молекулярный механизм действия оставались малоизученными. Методами мРНК-трансфекции и *in vitro* трансляции мы показали, что квасиноиды ингибируют биосинтез белка в клетках эукариот. Тоу-принтинг в клеточном лизате выявил остановку трансляции на стадии элонгации. С помощью криоэлектронной микроскопии была получена структура 80S рибосомы человека в комплексе с айлантоном, которая показала, что квасиноид препятствует аккомодации аминоктил-тРНК в А-сайте 60S субчастицы. Разрешение 2.24 Å позволило выявить межмолекулярные контакты ингибитора с пептидилтрансферазным центром. Ингибирование трансляции айлантоном сдерживает рост трансформированных клеточных линий, вызывая задержку в G0/G1-фазе, а в невысоких концентрациях повышает выживаемость культивируемых клеток при заражении пикорнавирусом. Сделанные находки открывают возможности для использования квасиноидов в клинике. *Работа поддержана грантом РФФ 20-14-00178.*

ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА – СРЕДСТВА ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПРЕПАРАТОВ

С.Е. Седых, В.А. Черенко, А.П. Парамоник, Г.А. Невинский

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Экзосомами называют везикулы диаметром 40–100 нм, секретируемые клетками эукариот. Они обнаружены в крови, лимфе, моче, молоке и других биологических жидкостях человека. Экзосомы имеют эндосомальное происхождение, покрыты мембраной и переносят различные биологически активные молекулы, например, микроРНК. Так как экзосомы могут легко проникать через клеточную мембрану и доставлять содержимое в цитоплазму клетки-реципиента, их считают перспективными средствами доставки в культуры клеток. Молоко является универсальным источником экзосом, доступным в препаративных объемах.

В данном исследовании разработана методика доставки различных биологически активных веществ в культуры клеток с использованием экзосом молока. Для доставки использовали известные цитостатические препараты: доксорубин, тамоксифен, доцетаксел и паклитаксел и опухолевую клеточную линию аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. После определения IC50 для каждого вещества, данную концентрацию к клеткам добавляли в сочетании с препаратом экзосом, выделенным из одного литра молока лошади, в различных разведениях (1000; 500; 100; 50 раз).

Показано, что добавление экзосом молока увеличивает цитотоксичность препаратов, добавляемых к культуре клеток. Экзосомы снижают жизнеспособность клеточной культуры от 20% до 50% по сравнению с добавлением индивидуального цитостатического препарата. Проведен анализ изменения экспрессии генов BAX, p53, и bcl-2 после добавления препаратов цитостатиков с экзосомами и без экзосом, показано различное изменение характера экспрессии.

В дальнейшем планируется исследование совместного внесения экзосом молока с цитостатиками на культурах клеток U-87 (глиобластома мозга человека), A549 (карцинома легкого человека), SK-N-SH (нейробластома мозга человека).

Известно, что экзосомы содержат короткие РНК, которые могут оказывать влияние на культуры клеток. Изучено содержание микроРНК 146b-5p, 148a-3p, 200c-3p, 378a-3p в препаратах экзосом молока до и после гель-фильтрации. Показано, что гель-фильтрация снижает содержание микроРНК в препарате экзосом в 4–17 раз.

Таким образом, экзосомы молока являются перспективными средствами для доставки противоопухолевых препаратов в культуры клеток.

Исследование поддержано проектом РФФ № 18-74-10055 (рук. Седых С. Е.).

ГЕНОМ. ПРОТЕОМ. МЕТАБОЛОМ

ВКЛАД НОВОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВАРИАНТА C.3968A>G ГЕНА BRCA2 В ПАТОГЕНЕЗ РАКА ЯИЧНИКОВ

Е.А. Андреева¹, Д.С. Прокофьева¹, Э.Т. Мингажева¹, Я.В. Валова¹, А.Х. Нургалиева¹, Э.К. Хуснутдинова^{1,2}

¹Башкирский государственный университет; ²Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

Рак яичников (РЯ) является одним из самых тяжелых онкогинекологических заболеваний. В многочисленных клинических и молекулярно-генетических исследованиях было показано, что по этиологии рак яичников является гетерогенным заболеванием. Наряду со спорадическими случаями, встречаются генетически обусловленные формы (составляют около 20% от общего числа (Н.Е. Кушлинский с соавт., 2021)). Одним из генов, ассоциированных с развитием данной нозологической формы, является BRCA2. В имеющихся исследованиях оценивается кумулятивный риск развития рака яичников при наличии мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 (к 70-летнему возрасту составляет 39-40% (К.В. Меньшиков с соавт., 2020)). Отдельный вклад мутаций в гене BRCA2 изучен недостаточно. Целью данного исследования стал поиск отобранного в результате ранее проведенного таргетного секвенирования нового миссенс варианта с.3968A>G (p.Lys1323Arg) в гене BRCA2 среди больных наследственным (n=76) и спорадическим РЯ (n=130), а также женщин контрольной группы (n=326). Работа проведена с использованием анализа кривых плавления с высокой разрешающей способностью (HRM). В результате выполненного скрининга была обнаружена 1/76 (1,32%) носительница данного изменения среди больных наследственным РЯ (НРЯ). У пациентки отмечаются, раннее начало заболевания, полинеоплазии (одновременная манифестация рака яичников и рака молочной железы) и отягощенный семейный анамнез. Других нарушений в важных генах-кандидатах РЯ у пациентки обнаружено не было и развитие заболевания в данном случае может быть связано с исследуемым миссенс вариантом. Носительница изменения с.3968A>G в гене BRCA2 среди других проанализированных выборок не обнаружено. Таким образом, исследованная аминокислотная замена p.Lys1323Arg объясняет небольшую часть случаев НРЯ в Республике Башкортостан. Для подтверждения патогенности данного изменения необходимы дополнительные функциональные исследования или исследования в дизайне «случай-контроль» на больших по объему выборках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение №1 от 28.12.21 г.); Министерства науки и высшего образования РФ (№ 075-03-2021-193 / 5).

ВЫЯВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ СПЛАЙСОСОМЫ

К.С. Ануфриева^{1,2}, В.О. Шендер^{1,2}, М.М. Лукина¹, Г.П. Арапиди^{1,2}

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

В последнее время всё больше внимания уделяется новому классу противоопухолевых агентов, направленных на ингибирование функции сплайсосомы. Одним из ключевых компонентов сплайсосомы является белок SF3B1, являющийся также основной мишенью многих ингибиторов сплайсинга (Пладисенолид Б/ E7107/ H3B-8800). Эффективность этих препаратов была показана для лечения различных типов злокачественных новообразований, таких как хронический лимфоцитарный лейкоз, аденокарцинома молочной железы, рак предстательной железы, аденокарцинома яичника и аденокарцинома толстой кишки. Было доказано, что эти молекулы эффективно устраняют опухолевые клетки в условиях, как in vitro, так и in vivo. Уже неоднократно было показано, что эти препараты вызывают множество изменений в сплайсинге пре-mРНК, однако до сих пор не предложен молекулярный механизм, объясняющий высокую противоопухолевую активность ингибиторов сплайсосомы. В этой работе мы исследовали, какие изменения происходят в опухолевых клетках в результате воздействия ингибиторов сплайсосомы. Мы провели мета-анализ данных РНК секвенирования опухолевых клеточных линий после воздействия различных ингибиторов сплайсинга. Результаты нашего мета-анализа показали, что в независимости от типа ингибитора сплайсинга и типа опухоли происходит уменьшение экспрессии около 2 тысяч общих генов. Функциональный анализ выявил, что транскрипты, кодирующие белки репарации двойных разрывов ДНК, являются наиболее супрессированными под воздействием ингибиторов сплайсосомы. Анализ изменения альтернативного сплайсинга показал, что наиболее частым событием сплайсинга является вырезание экзона в транскриптах, белки которых также участвуют в репарации двойных разрывов ДНК. На основании биоинформатического анализа мы показали, что найденные нами события вырезания экзонов приводят к сдвигу рамки считывания и возникновению преждевременных стоп-кодонов, которые провоцируют нонсенс-зависимый распад этих мРНК. Таким образом, результаты нашего исследования показали, что ингибиторы SF3B1 приводят к деградации мРНК, важных для репарации двойных разрывов ДНК. В связи с этим, может быть перспективным использование ингибиторов сплайсинга в комбинации с ДНК повреждающими химиопрепаратами, применяемыми в клинике.

Работа поддержана Грантом РФФ 22-15-00462.

ПРОБЛЕМА ПРОПУЩЕННЫХ ЗНАЧЕНИЙ В КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПРОТЕОМИКЕ

Л.А. Гарибова^{1,2}, В.И. Постоевко^{1,2}, Ю.А. Бубис², Л.И. Левицкий², М.В. Горшков², М.В. Иванов²

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

²ИНЭПХФ им. В.Л. Тальрозе ФИЦ ХФ РАН, Москва

МС/МС спектры используются в протеомике для идентификации пептидов, а для количественной оценки содержания белка часто используют интенсивность ион-хроматограмм его пептидов. Однако, не всегда удается сопоставить идентифицированный пептид и его ион-хроматограмму, что приводит к возникновению проблемы так называемых “пропущенных” значений (missing values) и искажает результаты количественного анализа белков. В работе был предложен и реализован на языке программирования Python новый алгоритм сопоставления пептидных идентификаций, полученных с помощью тан-

демной масс-спектрометрии, с их ион-хроматограммами из масс-спектра первого уровня. Алгоритм основан на одновременном использовании нескольких параметров: отношение массы к заряду m/z , заряд, время удерживания пептида в хроматографической колонке, ионной подвижность и ошибка нахождения моноизотопного пика в пептидном кластере. Отдельное внимание в работе уделено автоматическому нахождению ошибок определения используемых параметров. Для таких характеристик, как: отношение массы к заряду m/z , время удерживания пептида в хроматографической колонке и ионная подвижность, сопоставление происходит за счет построения распределения Гаусса и нахождения медианы и сигмы (среднеквадратичного отклонения). На примере нескольких наборов данных были проанализированы частоты возникновения пропущенных значений для предложенного алгоритма и классического подхода. Также были проанализированы различные варианты приоритета выбора ион-хроматограмм в случае, если возникает неопределенность и один MS/MS спектр может объясняться сразу несколькими ион-хроматограммами. Кроме того, были показаны случаи, когда стандартные подходы не сработали, а предложенный алгоритм корректно справился с задачей. Работа была выполнена при поддержке РФФ, грант № 21-74-10128.

АНАЛИЗ ПРОТЕОМА БАКТЕРИИ *HELICOBACTER CINAEDI* И ВЫЯВЛЕНИЕ ЕЁ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ

А.К. Воронина¹, Б.А. Ефимов⁴, М.В. Малахова¹, М.Е. Богомякова¹, П.В. Шнайдер¹, О.М. Иванова¹, М.А. Лагарькова¹, В.О. Шендер^{1,2}, В.М. Говорун¹, Г.П. Арапиди^{1,2,3}

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный; ⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва

Сердечно-сосудистые заболевания занимают первое место в структуре смертности во всем мире. Среди заболеваний сердца и сосудов наибольший вклад в смертность вносит атеросклероз. Согласно липопротеидной теории патогенеза атеросклероз может быть индуцирован нерегулируемым захватом модифицированных липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и очень низкой плотности неповрежденным эндотелием стенки сосудов. Опубликован ряд исследований, согласно которым нарушение метаболизма ЛПНП в макрофагах может быть вызвано внутриклеточным патогеном, микроорганизмом *Helicobacter cinaedi*, однако роль *H. cinaedi* в развитии патологии окончательно не доказана [Khan et al. // *Microbiol Immunol*, 2012; Khan et al. // *Scientific Reports*, 2014]. *Helicobacter* – род спиралевидных грамотрицательных энтерогепатических бактерий, представители которого могут вызывать бактериемию у людей. Наиболее распространенным возбудителем данного заболевания является *H. cinaedi*. В опубликованных работах показано, что *H. cinaedi* при взаимодействии с макрофагами вызывает их переход к так называемому «пенистому фенотипу», от английского «foam cells». Целью нашего исследования является детальное изучение изменений, которые происходят на уровне белков после заражения макрофагов бактерией *H. cinaedi*. Поскольку на данный момент для *H. cinaedi* не опубликовано протеомных исследований, для достижения поставленной цели мы провели масс-спектрометрический анализ протеома *H. cinaedi* на Q Exactive HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. Отдельной проблемой при работе с *H. cinaedi* является подбор условий культивирования, поскольку данный микроорганизм характеризуется высокими требованиями к составу атмосферы. В ходе работы мы опробовали различные подходы к выращиванию бактерии на твердых и жидких средах и определили наиболее благоприятные для *H. cinaedi* составы среды и наиболее эффективные методы создания требуемой атмосферы. Для выявления белковых факторов, которые могут способствовать патогенезу *H. cinaedi*, мы сделали анализ протеома бактерии до и после контакта с макрофагальными клетками. В результате анализа протеома бактерии мы обнаружили, что данный микроорганизм имеет ряд механизмов для выживания в неблагоприятных условиях, таких, как контакт с иммунными клетками или воздействие некоторых антибиотиков.

БЫСТРЫЙ СТОХАСТИЧЕСКИЙ НЕКРОЗ, АССОЦИИРОВАННЫЙ С ДЕЛЕНИЕМ - НОВЫЙ ТИП КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ, ОБНАРУЖЕННЫЙ В ХОДЕ ПОЛНОГЕНОМНОГО ПОИСКА МУТАНТОВ ДРОЖЖЕЙ С УВЕЛИЧЕННОЙ ВЕРОЯТНОСТЬЮ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

А.И. Александров¹, Э.В. Гросфельд^{1,2}, В.А. Бидюк², И.В. Кухтевич³, О.В. Митькевич¹, С.Е. Дмитриев⁴, В.Н. Гладышев⁵

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный; ³Институт функциональной эпигенетики, Объединение имени Гельмгольца, Мюнхен, Германия; ⁴НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва; ⁵Подразделение генетики, Центр женского здоровья им. Бригам Гарвардской медицинской школы, Бостон, США

Несмотря на то, что для многих организмов известно какие гены необходимы для жизни, мало что известно о генах, нарушении экспрессии которых увеличивают вероятность гибели клеток. Проанализировав, с помощью окрашивания флюксисом В, дрожжевые мутанты из коллекций с делетированными или репрессированными индивидуальными генами, удалось идентифицировать 83 жизненно-важных и 43 нежизненно важных гена, дисфункция которых увеличивает вероятность гибели клеток. Используя GO-term анализ обогащения по функциональной принадлежности генов, изменения уровня которых увеличивают гибель клеток, мы наблюдали обогащение генов, связанных с репликацией и репарацией ДНК, процессингом РНК, организацией хроматина и ядерного транспорта; митозом и цитокинезом и везикулярным транспортом и гликозилированием / гомеостазом клеточной стенки. Гены, принадлежащие к этим категориям, составляют ~ 45% выявленных в ходе исследования генов. Для изучения динамики клеточной гибели у этих мутантов, были разработаны методы анализа гибели новорожденных клеток (DON) и прижизненной микроскопии в реальном времени. Показано, что большинство выявленных мутантов имеют увеличенную вероятность гибели новорожденных клеток, причем ~ 95% идентифицированных нами мутан-

тов погибают в 3 и более раза чаще в раннем возрасте, нежели клетки дикого типа. Кроме того, обнаружено, что мутантные клетки преимущественно умирают в ходе деления или непосредственно во время цитокинеза. Предполагается, что универсальным следствием повреждения различных генов и возможной причиной стохастической гибели клеток дрожжей может быть нарушение гомеостаза плазматической мембраны. Это предположение отчасти подтверждается тем фактом, что большая часть флоксин-положительных мутантов оказалась чувствительной к обработке SDS, этанолом и калькофлюор белым. В тоже время, было обнаружено, что нейтральный внешний pH ~ в 93% случаев значительно снижает количество мёртвых клеток в колониях. Таким образом, нами был обнаружен феномен быстрой стохастической некротической гибели, ассоциированной с делением, которая возникает в ответ на дисфункцию некоторых генов, нивелируется воздействием нейтрального внешнего pH и может быть следствием поврежденной строения и/или функций мембраны.

Работа была поддержана грантом РФФ 21-74-10115.

ПОИСК И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АННОТАЦИЯ СПЛАЙС-ФОРМ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Г.В. Долгалев, Е.В. Поверенная

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Изменения в процессе альтернативного сплайсинга характерны для большинства злокачественных заболеваний. Так как известно, что продукты сплайс-форм одного гена могут иметь кардинально отличающиеся биологические функции, повышенная экспрессия отдельных сплайс-форм, характерная для определенного типа опухоли, может свидетельствовать о важности биологической роли этих сплайс-форм для развития и прогрессирования злокачественного заболевания. Целью данной работы является анализ дифференциальной экспрессии сплайс-форм, кодируемых одним геном человека, в различных типах злокачественных заболеваний и ее последствий на функциональном уровне. Для выполнения поставленной задачи были взяты данные проектов The Cancer Genome Atlas (TCGA) и Genotype-Tissue Expression (GTEx) для 19 типов опухолей (9064 образцов опухолевой ткани и 1481 образцов соответствующей нормальной ткани). Были отобраны только те пары транскриптов, которые обладали противоположным характером экспрессии как минимум в 75% образцов тканей опухоли и нормы. Всего в результате анализа были обнаружены 763 пары транскриптов с противоположным изменением экспрессии, из которых 102 пары были характерны для более чем 3 типов опухолей. Полученные пары дифференциально экспрессирующихся сплайс-форм были далее функционально охарактеризованы с точки зрения включения/исключения белковых доменов, сигнальных и регуляторных участков. Важность каждого события изменения экспрессии изоформ была также оценена с помощью пептидных данных, свидетельствующих в пользу существования соответствующих сплайс-форм на белковом уровне. Полученный ранжированный список пар сплайс-форм, кодируемых одним геном человека, послужит основой для дальнейших экспериментов с целью установления важных для прогрессии опухолей факторов и приведет к разработке новых эффективных методов терапии. *Данная работа выполнена в рамках гранта РФФ № 21-74-10061.*

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ ЖЕЛЕЗА НА ПРОРАСТАНИЕ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР МЕТОДАМИ УЛЬТРАБЫСТРОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Д.Д. Емекеева^{1,2}, Е.М. Казакова^{1,2}, О.А. Богословская², И.А. Тарасова²

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

²ИНЭПХФ им. В.Л. Тальрозе, ФИЦ ХФ РАН, Москва

В настоящее время стоит вопрос об улучшении качества и повышении урожайности культур, используемых в сельском хозяйстве. Для решения этой задачи используются биопрепараты для предпосадочной обработки растений, что, в свою очередь, требует анализ и контроль их характеристик, таких как длина проростков, сухая масса и др. Целью работы являлись разработка метода анализа морфометрических характеристик, таких как всхожесть и линейные размеры, проведение молекулярного анализа образцов, определение их белкового состава, а также исследование активируемых при обработке внутриклеточных процессов для выяснения влияния обработки зерна биопрепаратами на основе наночастиц и солей железа на прорастание пшеницы *Triticum aestivum* L. Первый этап решения поставленной задачи требует быстрых морфометрических измерений большого количества образцов растений, для чего был разработан программный код на основе компьютерного зрения, позволяющий сократить время измерений более чем в 10 раз по сравнению с измерениями, осуществляемыми вручную. Созданное программное обеспечение было протестировано на двух группах образцов: ростки пшеницы на 5, 6 и 7 дни прорастания и наборы ростков пшеницы, обработанные тремя концентрациями наночастиц железа. По результатам измерений второй тестовой группы были выбраны оптимальные концентрации наночастиц железа для проведения дальнейшего молекулярного анализа. Протеомный анализ является важным элементом мониторинга изменений в образцах на молекулярном уровне. Идентификация белков и определение их относительного количественного содержания осуществлялись методом ультрабыстрой хромато-масс-спектрометрии DigestMS1 [PMID: 32077687]. В ходе первой серии экспериментов был проведен анализ белкового состава необработанной пшеницы для оценки количества белковых идентификаций и тестировании метода ультрабыстрой хромато-масс-спектрометрии на растительных образцах. В ходе второй серии экспериментов было проведено сравнение образцов, обработанных препаратом на основе наночастиц железа, с контрольными образцами. На основе количественных измерений был проведен поиск дифференциально регулируемых белков, характеризующих изменения во внутриклеточных процессах, связанных с обработкой.

Работа осуществлялась при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-26-00109.

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ПРИЦЕЛЬНОГО ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ НЕПРЕРЫВНОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СБОРА, ХРАНЕНИЯ И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

А.А. Илюшкина¹, Н.А. Кициловская^{1,2}, О.В. Курилова¹, К.С. Горбунов¹, И.О. Бутенко¹, П.В. Башкиров¹,
В.М. Говорун¹ ¹НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора; ²ВИНИТИ РАН, Москва

Плазма крови является удобным клиническим материалом для проведения диагностических анализов. В клинической практике молекулярными мишенями при анализе плазмы являются циркулирующие в крови белки, а состав протеома плазмы отражает актуальный статус здоровья пациента. Сейчас для определения содержания белков в плазме крови в клинике преимущественно используются методы, основанные на иммунном взаимодействии, требующие разработки антител к каждому новому белку-мишени. Более гибким, чувствительным, специфичным и быстрым для разработки является метод прицельного ВЭЖХ-МС анализа, но их внедрение в клиническую практику ограничено.

Важной проблемой методик на основе ВЭЖХ-МС является контроль качества подготовки проб. Высокая специфичность ВЭЖХ-МС анализа, особенности подготовки проб и сложность состава плазмы крови приводят к тому, что небольшие отклонения в процессе подготовки проб искажают результат анализа. Нарушения при получении препарата плазмы крови, приводят к лизису клеток крови и выходу внутриклеточных белков в плазму крови, частичному свертыванию крови. Ошибки в хранении и транспортировке пробы приводят к деградации белков плазмы, нарушения процесса подготовки - к появлению нарушающих количественные характеристики метода артефактных пептидов и химических модификаций.

Для решения этой проблемы была создана аналитическая панель, позволяющая контролировать основные факторы искажения при анализе каждой пробы. Для 10 самых представленных белков плазмы были разработаны методы детекции пептидов, маркерных для нарушения процесса подготовки проб (окисление, дезамидирование, алкилирование и протеолиз). Разработаны методы детекции белков, свидетельствующих о лизисе клеток крови или свертывании крови. Созданную панель испытали в условиях отсутствия антикоагулянта, нарушений температурного режима хранения проб, ошибок при осаждении клеточных компонентов крови, ошибки в подготовке плазмы для ВЭЖХ-МС анализа.

Созданный метод позволяет оценить качество коллекции образцов и идентифицировать отдельные образцы низкого качества. Также определены наиболее важные параметры протоколов сбора проб для протеомного анализа.

Работа выполнена в рамках госзадания №1022040800383-5-3.5.2 «Разработка методов молекулярно-генетической диагностики для квантификации саногенеза у здоровых людей».

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ РНК В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ОПУХОЛЕЙ

А.Н. Казакова^{1,2}, К.С. Ануфриева^{1,2}, О.М. Иванова¹, В.О. Шендер^{2,3}, П.В. Шнайдер¹, М.М. Лукина^{1,4},
М.А. Лагарькова¹, Г.П. Арапиди^{2,3}

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва; ²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ⁴Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород

В настоящее время общепризнано, что опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) играют важную роль в развитии опухоли. Однако главным ограничивающим фактором в изучении ОАФ до сих пор является отсутствие точной характеристики этих клеток. Существующие маркеры, с помощью которых в различных исследованиях выявляют ОАФ, не универсальны для всех типов опухолей, кроме того, их экспрессия наблюдается и в других мезенхимальных клетках опухоли. Еще одной проблемой является отсутствие достоверных отличительных характеристик между ОАФ и нормальными фибробластами (НАФ). В данной работе мы всесторонне изучили отличительные особенности транскриптома ОАФ на основании биоинформатического анализа большого массива данных РНК секвенирования различных клеток опухолей и нормальных тканей. Создание собственного алгоритма поиска маркеров ОАФ позволило нам выявить список из 414 генов, которые специфичны для ОАФ во всех или хотя бы в нескольких исследуемых типах опухолей. Благодаря анализу общедоступных изображений, полученных с помощью методов иммуногистохимии, из числа предложенных маркеров были выбраны белки, которые локализируются в строме определенных типов опухолей. Помимо этого, мы выявили 12 универсальных белков, которые достоверно идентифицируют популяцию фибробластов во всех 9 исследуемых типах опухолей. Наши результаты позволяют исследователю подобрать наиболее подходящую комбинацию маркеров ОАФ с учетом представленности этих маркеров в каждом типе клеток изучаемой опухоли. В рамках нашего исследования мы также сравнили 3 различных подхода к изучению различий транскриптома НАФ и ОАФ. Мы показали, что использование данных секвенирования РНК одиночных клеток опухолей и нормальных тканей наилучшим образом подходит для этой задачи. Благодаря анализу данного подхода мы выявили общие отличия паттернов экспрессии генов между НАФ и ОАФ и показали, что эти гены участвуют в ремоделировании внеклеточного матрикса, регуляции нескольких сигнальных каскадов и метаболизма опухоли. Мы также показали, что остальные рассматриваемые нами подходы для сравнения транскриптома НАФ и ОАФ имеют существенные недостатки.

Работа поддержана грантом РФФ 22-75-00103.

ПЦР-СИСТЕМА ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОЙ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ MDA5, RIG-1 и IFIT-1

А.А. Ложков^{1,2}, М.А. Плотникова², М.А. Егорова², С.А. Клотченко^{1,2}, А.В. Васин^{1,2}

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого; ²НИИ группа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург

Индукция синтеза интерферонов опосредована активацией паттерн-распознающих рецепторов. Одновременный анализ экспрессии MDA5, RIG-1 и IFIT-1 позволяет оценить степень иммунной активации и оценить активацию IFN- α/β -ассоциированного апоптоза. Такая оценка особенно актуальна при анализе патогенеза острых респираторных вирусных ин-

ассоциированного апоптоза. Такая оценка особенно актуальна при анализе патогенеза острых респираторных вирусных инфекций. Целью работы являлась разработка ПЦР-системы для одновременной оценки уровня экспрессии MDA5, RIG-1 и IFIT-1. Тотальную РНК выделяли с помощью реагента TRIzol. Один мкг тотальной РНК обрабатывали ДНКазой, затем проводили реакцию обратной транскрипции. Подобранные в процессе работы праймеры и зонды, содержащие флуоресцентный краситель на 5'-конце и гаситель на 3'-конце, были синтезированы и очищены методом ВЭЖХ (Eurogen, Россия). Мультиплексную ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 12,5 мкл смеси BioMaster HS-qPCR (2×) (Биолабмикс, Россия) и 2 мкл кДНК. Реакционные смеси содержали: по 200 нМ каждого праймера и зонда для RIG-1 и IFIT-1, и 750 нМ каждого праймера и 250 нМ зонда для MDA5. Условия ПЦР: 95°C в течение 5 мин с последующими 40 циклами амплификации (95°C в течение 15 с, 61,3°C в течение 30 с). Рассчитанные значения эффективности мультиплексной ПЦР составили 98% (для RIG-1 и MDA5) и 97% (для IFIT-1).

С использованием разработанной системы была проведена оценка экспрессии вышеобозначенных генов в лимфоцитах, выделенных из цельной крови (ЛК) здоровых добровольцев и пациентов с респираторными заболеваниями (грипп А/Н3N2 или SARS-CoV-2). Оба вируса индуцировали в ЛК экспрессию RIG-1, в то время как уровни мРНК MDA5 и IFIT-1 повышались только при гриппе. Интересно, что значения экспрессии изученных генов у пациентов с SARS-CoV-2 имели больший разброс. Мы исследовали возможную корреляцию между экспрессией IFIT-1 и цитозольными сенсорами в ЛК: только в группе пациентов с SARS-CoV-2 наблюдалась прямая корреляция между экспрессией генов RIG-1 и IFIT-1 ($r^2 = 0,968$).

С использованием разработанной мультиплексной ПЦР для анализа уровней мРНК RIG-1, MDA5 и IFIT-1 было показано, что уровни мРНК MDA5 и IFIT-1 были повышены в ЛК пациентов, инфицированных гриппом, но не у пациентов с SARS-CoV-2.

Работа выполнена в рамках Государственного задания на проведение фундаментальных исследований 0784-2020-0023.

КОНВЕЙЕР С ОТКРЫТЫМ ИСХОДНЫМ КОДОМ ДЛЯ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ПРЯМОГО ВВОДА: МЕТАБОЛОМ ПЛАЗМЫ ЧЕЛОВЕКА

А.С. Козлова, Т.С. Шкригунов, С.А. Гусев, М.К. Гусев, Е.А. Пономаренко, А.В. Лисица

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Масс-спектрометрия прямого ввода (DIMS) становится эффективным методом скрининга биологических образцов в клинической метаболомике. Эффективность DIMS была достигнута за счет отказа от хроматографического разделения метаболитов. Будучи быстрым в исполнении, DIMS обычно требует специальных навыков в интерпретации результатов измерений. С точки зрения исходных данных масс-спектры ESI-QTOF и MALDI в некотором роде схожи в том смысле, что в обоих типах спектров отсутствует информация о времени удерживания при хроматографии. Для проверки этого сходства был протестирован конвейер обработки масс-спектров QTOF с использованием пакетов с открытым исходным кодом (MALDIquant, MSnbase и MetaboAnalystR). Раньше все алгоритмические рабочие процессы основывались на применении программ, либо предоставленных поставщиком, либо разработанных энтузиастами в частном порядке. Здесь мы с помощью вычислений рассмотрели два способа интерпретации результатов DIMS метаболомического профиля крови человека. Спектры были получены ранее с использованием ESI-QTOF maXis Impact II (Bruker Daltonics, Массачусетс, США), затем предварительно обработаны с помощью программного обеспечения COMPASS/DataAnalysis поставщика и сопоставлены с метаболитами с использованием сценариев MatLab, разработанных в лаборатории. В качестве альтернативы в этой работе мы использовали пакеты с открытым исходным кодом MALDIquant для предварительной обработки спектров и MetaboAnalystR для интерпретации данных вместо ограниченно доступных поставщиков и самодельных инструментов. Используя набор из 100 образцов плазмы (20 от добровольцев с нормальным индексом массы тела и 80 от пациентов на разных стадиях ожирения), мы наблюдали высокую степень соответствия аннотированных метаболомических путей между проприетарным пайплайном COMPASS/MatLab и нашим свободно доступным решением. MALDIquant/MetaboAnalystR.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЗМАТРИЧНОГО СИНТЕЗА ДНК ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИЛТРАНСФЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА TdT

А.А. Кузнецова, С.И. Сенчунова, Т.Е. Тюгашев, О.С. Федорова, Н.А. Кузнецов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

ДНК-полимеразы принимают участие в различных клеточных процессах, связанных с репликацией и рекомбинацией ДНК, а также в процессах репарации и поддержания целостности нуклеиновых кислот. Различия биологических функций этих ферментов связаны с клеточной локализацией, специфичностью к определенным структурам ДНК-матрицы, точностью и процессивностью. В настоящее время известны многие детали функционирования ДНК-полимераз, связанные с особенностями образования каталитического комплекса, специфическим узнаванием праймера и dNTP и каталитическими стадиями присоединения нуклеотида к «растущей» цепи. Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT) принадлежит семейству X ДНК-полимераз, которое у человека включает еще три фермента: Pol β , Pol μ , Pol λ . Все четыре представителя ДНК-полимераз семейства X у человека вовлечены в репарацию и восстановление целостности ДНК. Необходимо отметить, что структура каталитического домена у всех ферментов имеет общую архитектуру. Однако в отличие от матрице-зависимых «gap-filling» ДНК-полимераз Pol β , Pol μ , Pol λ , фермент TdT катализирует добавление 2'-дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP) независимым от матрицы способом, преимущественно связывается с одноцепочечной ДНК и не приспособлен к копированию матричной цепи. В ходе данной работы с использованием очищенного генно-инженерного препарата TdT установлено, что эффективность присоединения природных dNTP и скорость элонгации праймера зависят как от структуры азотистого основания, так и от иона-кофактора. Проведен детальный анализ особенностей образования фермент-субстратного комплекса и эффективности присоединения природных dNTP к ДНК-праймаерам различного нуклеотидного состава и строения. Анализ конформационных превращений фермент-субстратных комплексов в процессах связывания ДНК-праймаера и

ных позволила установить количественные характеристики механизма действия TdT, включающего процессы узнавания праймера и dNTP, образования каталитического комплекса, непосредственно каталитическую стадию присоединения нуклеотида к «растущей» цепи и последующую элонгацию/диссоциацию комплекса фермента с удлинённым праймером. *Работа поддержана грантом РНФ № 21-64-00017.*

ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМА СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ СТАРЕНИИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ И СНИЖЕНИЯ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Н.С. Курочкина¹, М.А. Виговский², Т.Ф. Вепхвадзе^{1,2}, П.А. Махновский¹, О.А. Григорьева², Е.М. Леднев¹, А.Ю. Ефименко², Д.В. Попов^{1,2}

¹Институт медико-биологических проблем РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Исследованы изменения транскриптома скелетной мышцы человека при старении на фоне хронического воспаления и снижения двигательной активности. Транскриптомный профиль (РНК секвенирование) скелетной мышцы пожилых пациентов с первичным артрозом коленного/тазобедренного сустава (ОР, n=37) сопоставляли с транскриптомом молодых здоровых добровольцев (УН, n=15). Для выявления роли хронического воспаления и снижения двигательной активности в изменении генной экспрессии, УН сопоставляли с группой молодых пациентов с артрозом (УР, n=7). Для оценки влияния возраста сопоставляли группы УР и ОР. Пробы ткани из m. vastus lateralis у пациентов брали перед операцией по замене сустава, у здоровых людей – с помощью игольчатой биопсии. Двигательная активность не различалась между группами пациентов и была значительно ниже, чем у УН. Маркеры воспаления были сопоставимы между ОР и УР, но значительно выше, чем в УН. В группе ОР по сравнению с УН наблюдались метаболические нарушения. У старых людей (сравнение ОР vs. УН) гены с повышенной экспрессией (2260) были ассоциированы с процессами воспаления и перестройкой внеклеточного матрикса; гены с пониженной экспрессией (1086 генов) кодировали белки митохондрией и регуляторы углеводного обмена. У молодых пациентов (сравнение УР vs. УН) гены, увеличившие экспрессию (1868), были связаны с воспалением и биогенезом внеклеточного матрикса, а уменьшившие (605), кодировали митохондриальные белки. Эти изменения были сопоставимы, но менее выражены, чем при сравнении ОР vs. УН. Сравнение ОР vs. УР показало, что у пожилых пациентов изменения генной экспрессии значительно менее выражены, чем в остальных случаях: 353 и 121 снизили и увеличили экспрессию, соответственно. У старых пациентов с первичным артрозом происходят выраженные изменения транскриптома скелетных мышц (ОР vs. УН). Большинство из этих изменений были обнаружены у молодых пациентов с артрозом и сниженной двигательной активностью относительно молодых здоровых людей (УР vs. УН). Это говорит о том, что воспаление и снижение двигательной активности являются ключевыми факторами, индуцирующими возраст-зависимые изменения транскриптома скелетных мышц.

Работа поддержана РНФ (грант 21-15-00405, биоматериалы здоровых добровольцев, транскриптомное исследование, биоинформатическое исследование), государственным заданием МГУ им. М.В. Ломоносова и выполнена с использованием оборудования, полученного в рамках программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова (биоматериалы пациентов, клинические и лабораторные исследования).

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРА СПЛАЙСИНГА ПЛАДИЕНОЛИДА-Б В КОМБИНАЦИИ С ЦИСПЛАТИНОМ НА МОДЕЛИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

М.М. Лукина^{1,2}, К.С. Ануфриева^{1,2}, В.С. Бойченко², О.М. Иванова^{1,2}, П.В. Шнайдер^{1,2,3}, Г.П. Арапиди^{1,2,4}, М.А. Лагарькова^{1,2}, В.М. Говорун⁵, В.О. Шендер^{1,2,4}

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России; ²ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России; ³МГУ им. М.В. Ломоносова; ⁴Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ⁵НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Основным недостатком современной противоопухолевой химиотерапии является формирование резистентности к используемым препаратам. В связи с этим, поиск новых мишеней и комбинаций препаратов является актуальной задачей в современной онкологии. Сплайсосомный аппарат может быть использован в качестве мишени для новых терапевтических агентов, поскольку сплайсинг мРНК представляет собой терапевтическую уязвимость для множества видов опухолей. Ранее нами было показано, что низкие дозы ингибитора сплайсосомы не вызывают гибели нормальных и опухолевых клеток, но увеличивают чувствительность последних к цисплатину [Anufrieva K.S. et al./Genome Med, 2018]. Однако, механизм действия данной комбинации не был установлен. Таким образом, целью данной работы являлось исследование молекулярного механизма противоопухолевого действия пладиенолида-Б (Пл-Б) и цисплатина (ЦП) на клетках аденокарциномы яичника SKOV3. Схема эксперимента: клетки инкубировались 48 часов с низкой концентрацией Пл-Б (1,5 нМ), а затем со стандартной дозой IC50 ЦП (10 мкМ) от 6 до 48 часов в зависимости от эксперимента. По результатам МТТ теста и теста по оценке степени некроза и апоптоза было установлено, что предварительная инкубация клеток с Пл-Б повышает их чувствительность ЦП и приводит к увеличению апоптоза по сравнению с клетками, обработанными только ЦП. В результате анализа протеомных профилей и транскриптома клеток было выявлено, что комбинация Пл-Б и ЦП нарушает сигнальные пути, важные для ответа опухолевых клеток на повреждение ДНК (регуляция клеточного цикла, репарация ДНК) по сравнению с клетками, обработанными только ЦП. По результатам иммунофлуоресцентного исследования на γ -H2AX было показано снижение фокусов при комбинации препаратов по сравнению с клетками, обработанными только ЦП, что может говорить о снижении способности клеток к обнаружению повреждений ДНК и/или запуску реакций репарации. Таким образом, в результате исследования была установлена эффективность применения предварительной инкубации клеток SKOV3 с Пл-Б для увеличения чувствительности клеток к ЦП. Показано нарушение регуляции сигнальных путей ответа клетки на ДНК повреждение.

Работа поддержана грантом РНФ №22-15-00462 (за LC-MS/MS анализ) и грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования РФ (за RNAseq).

ВОССТАНОВЛЕННЫЙ НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИД – ЕСТЕСТВЕННЫЙ УФ-ФИЛЬТР ХРУСТАЛИКА ПТИЦ

Н.А. Осик^{1,2}, Е.А. Зеленцова^{1,2}, К.А. Шаршов³, Ю.П. Центалович¹

¹Международный томографический центр СО РАН; ²Новосибирский государственный университет; ³ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск

К функциям хрусталика глаза человека относят фокусировку света на сетчатке и поглощение вредоносного УФ излучения. Последнее обеспечено высоким содержанием низкомолекулярных соединений – УФ-фильтров. Помимо защиты сетчатки от фотоиндуцированных повреждений, данные метаболиты снижают влияние хроматических аберраций на ретинальное изображение, то есть напрямую влияют на остроту зрения. На сегодняшний день молекулярные УФ-фильтры обнаружены только в хрусталиках человека, некоторых приматов и белчих. Большой интерес представляет метаболомный состав хрусталиков птиц, отличающихся особо острым зрением. Известно, что хрусталики некоторых птиц поглощают УФ вплоть до 400 нм. Однако, молекулярная природа данного поглощения, так же как и метаболомный состав ткани хрусталика птиц, не была исследована до сих пор.

В данной работе был проведен количественный метаболомный анализ хрусталиков 13 различных видов птиц. Было обнаружено, что хрусталики некоторых хищных (черный коршун, обыкновенный канюк) и водоплавающих птиц (*Podicipedidae*) содержат необычно высокие уровни восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД-Н) и характеризуются чрезвычайно низким соотношением [НАД⁺]/[НАДН]. Фотохимический анализ показал, что свойства НАД-Н в качестве УФ-фильтра не уступают свойствам УФ-фильтров в хрусталике человека. НАД-Н эффективно поглощает УФ-А излучение, является крайне фотостабильным как в аэробных, так и в анаэробных условиях, а также имеет низкий выход триплетного состояния, флуоресценции и фотоиндуцируемых радикалов. Основным каналом распада фотовозбужденного состояния НАДН является внутренняя конверсия в основное состояние. Таким образом, в данной работе впервые было обнаружено, что НАД-Н является естественным УФ-фильтром хрусталика птиц. Полученные результаты способствуют нашему пониманию чрезвычайно высокой остроты зрения хищников.

Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФ проект № 22-23-00021.

ЭФФЕКТИВНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТЕЙ ПЕПТИДНЫХ СИГНАЛОВ В СПЕКТРАХ MS1 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕСКОЛЬКИХ АЛГОРИТМОВ ДЛЯ ПОИСКА ПЕПТИДНЫХ КЛАСТЕРОВ

В.И. Постоевко, Л.А. Гарибова, М.В. Иванов, Ю.А. Бубис, Л.И. Левицкий, М.В. Горшков

Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе, ФИЦ химической физики РАН им. Н.Н. Семенова, Москва

Протеомный анализ в скорострельной протеомике основан на использовании хроматомасс-спектрометрии. Сначала белки расщепляются на пептиды при помощи различных протеаз или химических агентов. Смесь пептидов разделяется на хроматографической колонке, ионизируется и поступает в масс-спектрометр, где регистрируются масс-спектры первого (MS1) и второго уровней (MS2). Спектры MS1 содержат информацию о значениях отношения массы к заряду и интенсивностей ионов пептидов. В то же время, спектры MS2 предоставляют подобную информацию для ионов фрагментов пептидов. MS2 спектры позволяют идентифицировать пептиды и, впоследствии, белки. Информация об интенсивности пептидного кластера является количественной метрикой пептида в дальнейшем анализе, а также участвует в дополнительной идентификации пептидов без использования MS2 (match-between-runs подход). В данной работе представляется метод для более точного определения интенсивности пептида, основанный на одновременном использовании нескольких программ для детектирования пептидных кластеров. Метод реализован в виде алгоритма на языке программирования Python в составе программного комплекса включающего в себя автоматизацию процесса обработки данных количественного анализа от стадии поиска пептидных кластеров до финальных статистических тестов. Для повышения точности определения интенсивности алгоритм выбирает для каждого пептида лучший набор интенсивностей из полученных несколькими программами для детектирования пептидных кластеров. Для оценки качества работы алгоритма использовались несколько наборов данных, в числе которых образцы клеточной линии глиобластомы человека обработанные интерфероном и смеси протеомов клеточных линий HeLa и *E. coli* различных концентраций. На тестовых данных линий HeLa и *E. coli* алгоритм путем более точного определения ложных сопоставлений повысил количество дифференциально экспрессированных (ДЭ) белков без превышения заданного уровня достоверности. Применение алгоритма на экспериментальных данных глиобластомы также позволило добиться увеличения числа ДЭ белков, в сравнении с использованием стандартного подхода. *Работа была выполнена при поддержке РФФ, грант № 21-74-10128.*

СЕГМЕНТАЦИЯ ФЕНОТИПОВ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛЕЙ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА

А.А. Степанов, А.Т. Копылов, Д.В. Петровский, В.Р. Руднев, К.А. Мальсанова, А.Л. Кайшева

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Масс-спектрометрическое профилирование позволяет получить информацию о белковом и метаболическом составе биологических образцов. Однако недостаточная эффективность вычислительных поисковых алгоритмов соотнесения тандемных спектров (ВЭЖХ-МС/МС) с молекулярными компонентами белками и метаболитами существенно ограничивает использование стратегии «омикс»-профилирования и классификации нозологий. Перспективной представляется разработка методов машинного обучения для интеллектуального анализа необработанных масс-спектрометрических (ВЭЖХ-МС/МС) измерений без применения процедур предварительной биоинформатической обработки и идентификации результатов измерений. В нашем исследовании разработаны две модели нейронных сетей: одномерной (1-CNN) и трехмерной (3-CNN) сверточной нейронной сети для сегментации трех видов рака путем анализа панорамных данных метаболического и протеомного состава

образцов плазмы крови. Мы показали, что обе нейронные сети могут быть успешно применены для анализа «омикс»-данных в формате «mfgf» и классификации фенотипов рак почки (гендерно-смешанный тип), рака яичников и предстательной железы (гендерно-специфический тип), а также фенотипа условно-здоровых участников исследования. Сегментация онкопатологий с применением 1-CNN и 3-CNN моделей характеризуется точностью на уровне 0,95.

Результатом исследования является получение сведений о схожести фенотипов. Наиболее близкими по молекулярному составу (белки и метаболиты) являются рак яичников и рак почки, а также рак предстательной железы и рак почки. Напротив, здоровый фенотип был наиболее отдален от онкологических фенотипов. Нейронные сети позволяют успешно классифицировать фенотипы, а также определять их сходство (матрица расстояний), преодолевая тем самым алгоритмические барьеры при идентификации спектров ВЭЖХ-МС/МС. *Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение No 075-15-2022-305).*

МЕТАБОЛОМНЫЙ АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ПРОДРОМАЛЬНОЙ СТАДИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА ДЛЯ СИСТЕМНОЙ ОЦЕНКИ РИСКА ВОЗНИКНОВЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ПЕРСОНАЛИЗАЦИИ ФАРМАКОТЕРАПИИ

О.П. Трифонова¹, Д.А. Абаимов², Д.Л. Маслов¹, Е.Е. Балашова¹, Е.Ю. Федотова², В.В. Полещук²,

С.Н. Иллариошкин², П.Г. Лохов¹ ¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича; ²Научный центр неврологии, Москва

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по частоте нейродегенеративным заболеванием, представляющим собой значительную медицинскую и социально-экономическую проблему. Медицина до сих пор не имеет четкого ответа на вопрос, почему развивается болезнь и какой должна быть эффективная профилактика. В настоящее время ведутся интенсивные исследования как по оценке рисков возникновения заболевания, так и средств продления жизни больных и повышения ее качества. Одним из перспективных направлений являются исследования продромальной стадии БП с целью поиска ранних биохимических нарушений для создания методов оценки риска возникновения БП, а также своевременной и персонализированной профилактической фармакотерапии. В данной работе исследована связь между метаболическим профилем пациентов, отражающим основные биохимические процессы, протекающие в организме больного, и динамикой БП от продромальной до развернутой стадий, причем как с учетом генетических данных, так и проводимой фармакотерапии. Был проведен сравнительный анализ медико-генетических данных и метаболических профилей полученных масс-спектрометрией образцов крови здоровых добровольцев (n=100) и пациентов с БП (n=200). Выборка больных с семейной и sporадической БП включала как фармакологически наивных больных БП, так и пациентов на леводопотерапии на разных стадиях развития заболевания, у которых провели скрининг на мутации в генах глюкоцереброзидазы (GBA), богатой лейцином повторяющейся киназы 2 (LRRK2), E3-убиквитин-лигазы (PARK2), альфа-синуклеина (SNCA) и PTEN-индуцируемой киназы 1 (PINK1). На основе полученных данных был предложен прототип масс-спектрометрического метаболомного анализа крови для оценки риска возникновения БП, степени вовлеченности биохимических процессов, и своевременного назначения персонализированной профилактической фармакотерапии с учетом генетических особенностей пациента.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-01125.

ПОТЕНЦИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ИНДУЦИРОВАННЫХ ХИМИОТЕРАПИЕЙ СЕКРЕТОМОВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ЕГО РОЛЬ В ПРИОБРЕТЕНИИ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

П.В. Шнайдер^{1,2,3}, И.К. Мальянц³, О.М. Иванова^{2,3}, К.С. Ануфриева^{2,3}, Г.П. Арапиди^{2,3,4}, В.М. Говорун⁵,

М.А. Лагарькова^{2,3}, В.О. Шендер^{2,3,4}

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ⁴Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; ⁵НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

В последнее время все больше внимания стало уделяться вкладу межклеточной коммуникации в процесс формирования химиорезистентности опухолевыми клетками. Ранее нами было показано, что под действием химиопрепарата цисплатина погибающие клетки аденокарциномы яичника секретируют во внеклеточное пространство сигнальные молекулы, способствующие формированию химиорезистентности в реципиентных опухолевых клетках. Протеомный анализ показал, что в состав секретомов от погибающих опухолевых клеток (TIS) входят компоненты сплайсосомы, рибосомы, протеасомы, стрессовых гранул, а также белки, участвующие в клеточном метаболизме. Для изучения вклада таких секретомов в формирование химиорезистентности нами был проведен протеомный анализ реципиентных клеток, инкубированных с TIS или контрольными секретоматами от необработанных клеток (в течение 72 часов) с дальнейшим добавлением цисплатина (на 24 часа). Общий протеомный профиль реципиентных клеток под действием цисплатина показал, что инкубация с TIS приводит к более обширному и, возможно, более быстрому ответу клетки на цисплатин. Так, в реципиентных клетках изменялись процессы, связанные с клеточным циклом, репарацией ДНК, трансляцией и метаболизмом. Можно предположить, что поступившие в клетку компоненты TIS, отвечающие за сплайсинг пре-мРНК и синтез белка, ускоряют клеточный ответ на цисплатин на трансляционном уровне, тем самым, способствуя выживанию опухолевой клетки. Анализ клеточного цикла реципиентных клеток показал, что вызванный цисплатином арест в S фазе клеточного цикла происходит более эффективно, если реципиентная клетка была обработана секретомом от погибающих клеток. Продолжительный арест клеточного цикла в условиях повреждения ДНК способствует более полной репарации ДНК и избеганию апоптоза. Таким образом, мы показали, что преинкубация опухолевых клеток с TIS повышает эффективность клеточного ответа на химиотерапию как на протеомном, так и на фенотипическом уровне. *Данная работа была поддержана грантом Российского научного фонда 22-75-10143 (работа с клетками) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 075-15-2019-1669 (протеомный анализ).*

СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗОВ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Е.Н. Ильина *НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва*

Микробиом человека представляет собой сбалансированную экосистему, принимающую участие в реализации защиты организма хозяина от патогенных микроорганизмов посредством усиления барьерной функции эпителия и модуляции иммунитета. Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования совершило революцию в изучении композиции природных микробиоценозов человека и позволило описать совокупность молекулярных маркеров, отражающих их состав в норме и при формировании патологического процесса.

Проведенные нами в рамках консорциума проекта Русский Метагеном исследования позволили охарактеризовать паттерны молекулярных маркеров микробиоты кишечника при воспалительных заболеваниях кишечника (язвенный колит, болезнь Крона), болезни Паркинсона, рассеянном склерозе, алкоголизме.

Пандемия новой коронавирусной инфекции сместила акцент проводимых метагеномных исследований с кишечного на респираторный биотоп. Известно, что комменсальные бактерии верхних дыхательных путей человека осуществляют барьерную функцию, предотвращая и подавляя развитие респираторных инфекций. В частности, виды рода *Corynebacterium* ассоциированы со стабильностью микробиома носовой полости и пониженным риском возникновения инфекций у детей. Исходя из собственных данных, присутствие в респираторном биотопе стрептококков и гемофильной палочки более характерно для пациентов с относительно легким течением COVID-19, тогда как у более тяжелых пациентов чаще выявляются непатогенные нейссерии и вейлонеллы. *Работа поддержана грантом РФФ 21-15-00431.*

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ АНТИГЕН-ПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ ВЕЗИКУЛ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ CAR-T КЛЕТОК

В.М. Украинская^{1,2}, Ю.П. Рубцов¹, М.А. Масчан², А.Г. Габибов¹, А.В. Степанов¹

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева МЗ РФ, Москва

Использование Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором (CAR-T), доказало свою эффективность при терапии рака. Так, иммунотерапия CAR-T, направленная на антиген CD19, вызывает выраженные клинические ответы у пациентов с лейкемией и лимфомой, включая высокую долю устойчивых полных ремиссий. Несмотря на успех CAR-T-терапии при гематологическом раке, на сегодняшний день она гораздо менее эффективна при солидных опухолях, в связи с агрессивным микроокружением, которое негативно влияет на пролиферацию Т-клеток. Поиск подходов для повышения эффективности терапии в этой ситуации, несомненно, является приоритетным направлением в области иммунотерапии. Одним из возможных решений проблемы может стать реактивация CAR Т-клеток, которые уже находятся в агрессивных условиях опухолевого микроокружения, при помощи антиген-презентирующих искусственных везикул. Наличие опухолевого антигена на поверхности везикул позволяет таргетно стимулировать CAR Т-клетки, без участия дополнительных ко-стимулирующих агентов и Т-клеточного рецептора. Для конструирования искусственных везикул, экспрессирующих антигены CAR, в данной работе был использован цитохалазин В, химический агент, который приводит к отслоению плазматической мембраны и образованию закрытых мембранных структур, нагруженных специфичными антигенами. Данные антиген-презентирующие везикулы оказались эффективными в стимуляции и экспансии CAR-T клеток и способны к усилению их функциональной активности. Разработанный нами подход также позволил упростить идентификацию, отслеживание и ведение в культуре активированных CAR-T-клеток, пригодных для клинических целей.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-29-04087_тк.

МЕЖКЛЕТОЧНАЯ КОММУНИКАЦИЯ, ОПОСРЕДОВАННАЯ КОМПОНЕНТАМИ СПЛАЙСОСОМЫ: РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКА

В.О. Шендер^{1,2,3}, П.В. Шнайдер^{1,2}, К.С. Ануфриева^{1,2}, О.М. Иванова^{1,2}, Г.П. Арапиди^{1,2,3}, М.А. Лагарькова^{1,2}, В.М. Говорун⁴

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ⁴НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

В процессе лечения наблюдается быстрая эволюция злокачественных опухолей, сопровождающаяся адаптацией опухолевых клеток к лечебному воздействию. Ранее мы показали, что опухолевые клетки, погибающие под действием химиотерапии (ХТ) как в условиях *ex vivo* (парные асцитные жидкости пациентов до и после ХТ), так и *in vitro* (кондиционные среды), секретируют во внеклеточное пространство белки сплайсосомы. Такие секретомы от погибающих клеток многократно повышали устойчивость реципиентных клеток к последующей ХТ. Следовательно, внеклеточная передача сигналов может быть ключевым фактором, способствующим возникновению резистентности к терапии. Чтобы исследовать, какие параметры, запускаемые внешними стимулами, приводят к изменению фенотипа опухолевых клеток на более агрессивный, было проведено транскриптомное секвенирование трех типов образцов: (I) клеток, выделенных из пациентов до и после ХТ, (II) клеток, обработанных асцитными жидкостями до и после ХТ, а также (III) клеток рака яичников SKOV3, инкубированных с кондиционными средами, полученными до и после обработки цисплатином. Сравнение профилей экспрессии генов показало, что во всех трех моделях секретомы после ХТ индуцировали активацию эпителиально-мезенхимального перехода (EMT),

репарацию ДНК и сигнального пути МУС. Мы подтвердили, что секретомы от погибающих клеток вызывают мезенхимальную трансформацию с помощью биологических тестов. Сравнение альтернативного сплайсинга показало, что общими для всех трёх моделей являются изменения сплайсинга генов, вовлеченных в сплайсинг мРНК, хромосомную сегрегацию, а также репарацию ДНК. Таким образом, даже кратковременная инкубация хемонаивных опухолевых клеток с секретомы после ХТ вызывает изменения, подобные тем, которые мы наблюдали в резистентных опухолевых клетках пациентов после длительной терапии. Мы предполагаем, что циркулирующие во внеклеточном пространстве факторы сплайсинга могут «подготовить» интактные опухолевые клетки к последующему лекарственному воздействию. Знания об этих механизмах могут быть полезны для разработки новых подходов комбинированной ХТ в сочетании с традиционными препаратами.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1669 (транскриптом) и РФФ №22-15-0462 (работа с клетками).

ГРАФОВОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРОТЕОМНЫХ ДАННЫХ КАК ИНСТРУМЕНТ АНАЛИЗА РЕГУЛЯЦИИ ПРОТЕОМА

И.О. Бутенко, А.А. Лазарева, В.А. Маркашева, Фисунов Г.Ю., Д.С. Матюшкина, В.М. Говорун

НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Размеры геномов бактерий могут отличаться в размере более чем в 10 раз, как и количество белков, составляющих их протеом. Также, драматически отличаются биологические ниши, занимаемые этими бактериями. Основным способом регуляции протеома является изменение экспрессии генов, но помимо этого описан ряд других влияющих на состав бактериального протеома механизмов, работающих на стадии трансляции. Независимо от размеров генома, количества описанных факторов транскрипции, установленной степени корреляции между транскриптомом и составом протеома, бактерии успешно адаптируются к различным условиям среды и стрессам в природе и *in vitro*. Накопленный массив количественных протеомных данных для бактерий с разным размером генома из разных биологических ниш позволяет провести масштабные сравнительный анализ характера регуляции протеомов бактерий. Нашим коллективом был разработан и реализован алгоритм, позволяющий объединить данные количественного протеомного анализа, определить степень ко-регуляции белков, представить их в виде взвешенного графа зависимостей белков и описать структуру такого графа. С помощью разработанного инструмента был проведен сравнительный анализ характера регуляции для *E. coli*, *M. hominis*, *M. gallisepticum* и *M. tuberculosis*, выделены модули ко-регулируемых белков и дано описание протеомов через степени связности и другие свойства структуры соответствующих графов. *Работа выполнена в рамках государственного задания №1022040800170-3-1.6.23 "Создание искусственных клеточных систем".*

ПОДБОР РЕФЕРЕНСНЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ АНАЛИЗА CNV ПО ДАННЫМ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

В.Д. Гордеева^{1,2}, Д.М. Тарасова^{2,3}, Г.П. Арапиди^{2,3,4}

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет); ⁴Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

В настоящее время “золотым стандартом” для диагностики многих генетических заболеваний, обусловленных такими крупными хромосомными перестройками как вариации по числу копий (CNV), является хромосомный микроматричный анализ (ХМА). В то же время, данные полноэкзомного секвенирования (WES), которое также включено в клинические протоколы, могут быть использованы для детекции CNV. Существующие алгоритмы основаны на сравнении покрытия целевых регионов в исследуемом и референсных образцах, при этом сама методика подбора референсных образцов не определена явно и в большинстве случаев остается на усмотрение исследователей. В рамках этой работы мы оценивали влияние выбора референсных образцов на эффективность детекции CNV по данным полноэкзомного секвенирования. В исследование были включены 45 человек, детекция CNV по данным WES осуществлялась с помощью алгоритма EXCAVATOR2. Для валидации результатов предсказаний были использованы данные ХМА, область сравнения была определена с учетом неравномерного распределения зондов чипа и экзонов по геному. Исходя из кластеризации образцов на основе покрытия целевых регионов были предложены следующие способы подбора референсных образцов: все оставшиеся образцы, все из того же запуска, что и исследуемый образец, набор наиболее скоррелированных по покрытию и случайный набор образцов. Было показано, что при небольшом наборе (менее 30) случайных образцов в качестве референса результаты предсказаний CNV плохо воспроизводятся, в отличие от скоррелированного набора образцов. Также мы отметили снижение точности идентификации при использовании всех образцов, что может быть объяснено их геномной вариабельностью. Согласно полученным результатам оптимальным вариантом будет выбор не менее 10 наиболее скоррелированных по покрытию образцов. *Работа поддержана грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.*

РЕКОНСТРУКЦИЯ РЕГУЛОМОВ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА FUR У БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА MYCOPLASMATACEAE

Д.В. Евсютина^{1,2}, Г.Ю. Фисунов^{1,2}, В.М. Говорун¹

¹НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Белки FUR (ferric uptake regulator) представляют собой распространённое семейство прокариотических регуляторов транскрипции. Это разнообразная группа регуляторов, специализирующихся на контроле метаболизма железа, цинка, марганца, никеля, меди, гема, а также реакции на окислительный стресс. Fur, фактор транскрипции, давший название семейству, первоначально характеризовался как регулятор гомеостаза железа. Поступление железа в клетку, а также его хранение,

должно находиться под жестким контролем, из-за высокой токсичности гидроксильных радикалов, образующихся в результате реакции Фентона. Долгое время считалось, что это специализированный регулятор системы обмена Fe^{2+} , однако в последнее время появляется все больше работ, указывающих на то, что Fug – глобальный регулятор. У патогенных бактерий, помимо обеспечения защиты от активных форм кислорода и транспорта ионов металлов, Fug белки контролируют вирулентность бактерии, способность взаимодействовать с клеткой хозяина. Белки семейства FUR найдены у бактерий семейства *Mycoplasmataceae*. Это специализированная ветвь бактерий, обладающих редуцированным геномом с малым набором известных регуляторов. Большинство представителей класса являются патогенами широкого круга животных, в том числе и человека. В этой работе мы рассмотрели распределение генов, кодирующих белки семейства FUR, а также их консервативность у представителей семейства *Mycoplasmataceae*. Далее мы реконструировали регулоны Fug белка. С помощью метода CRISPR интерференции нам удалось экспериментально подтвердить ряд мишеней у *Mycoplasma gallisepticum*, патогена птиц. Принимая во внимание наши ранее полученные данные транскрипционного анализа *M. gallisepticum* под воздействием окислительного стресса, мы проверили, влияет ли уровень Fug на способность клеток бактерии справляться с окислительным стрессом. *Работа выполнена в рамках проекта №1022040800170-3.*

ПОВЫШЕНИЕ ПРЕДСТАВЛЕННОСТИ СПЛАЙСИНГОВЫХ ФАКТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ СПОСОБСТВУЕТ ИХ ВЫЖИВАНИЮ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ДНК

О.М. Иванова¹, С.В. Другова², П.В. Шнайдер^{1,2}, К.С. Ануфриева^{1,2}, Г.П. Арапиди^{1,2,4}, М.А. Лагарькова^{1,2}, В.М. Говорун³, В.О. Шендер^{1,2,4}

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России;

²ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России; ³НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора; ⁴Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

Ранее нами было показано, что в секретах от погибающих под действием химиотерапии (ХТ) опухолевых клеток повышена представленность различных белков сплайсосомы*. Такие секреты способствуют выживанию соседних опухолевых клеток, многократно повышая их устойчивость к последующей ХТ. Экзогенные сплайсосомные белки в составе внеклеточных везикул способны проникать в окружающие опухолевые клетки, однако последующий ход событий такого типа межклеточной коммуникации не ясен. Чтобы исследовать, какие преимущества опухолевым клеткам дает повышенная представленность в них белков сплайсосомы, мы получили две линии клеток аденокарциномы яичников со стабильной сверхэкспрессией генов SYNCRIP и SNU13. Оценив уровень апоптоза в популяции опухолевых клеток, мы показали, что сверхэкспрессия этих белков приводит к формированию резистентности клеток к цисплатину. Чтобы исследовать роль данных белков в возникновении химиорезистентности клеток аденокарциномы яичников, был проведен протеомный и транскриптомный анализ клеток с и без сверхэкспрессии SYNCRIP и SNU13 через 12 и 24 ч после обработки цисплатином. В обеих клеточных линиях в ответ на цисплатин изменялся сплайсинг генов, участвующих в репарации ДНК. Так, в этих клетках эффективнее, чем в контрольных клетках без сверхэкспрессии, происходит вырезание интронов в пре-мРНК гена экзонуклеазы EXO1, участвующей в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов и двухцепочечных разрывов. В транскриптах генов BRCA1 и XPA наблюдалось более эффективное включение экзонов, важных для функционально активного белка. На белковом уровне в опухолевых клетках со сверхэкспрессией SYNCRIP повышалась представленность белков эксцизионной репарации, а в клетках со сверхэкспрессией SNU13 – белков гомологичной репарации. Все полученные нами омиксные данные свидетельствуют о функциональной значимости сплайсинговых факторов SYNCRIP и SNU13 при ответе опухолевых клеток на ХТ. По всей видимости, сверхэкспрессия обоих белков облегчает ответ опухолевых клеток на цисплатин, вероятно, за счет активации путей репарации повреждений, вызванных цисплатином. *Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2019-1669 (протеом, транскриптом).*

*Anufrieva K.S. et al.// *Genome Med*,2018; Pavlyukov M.S. et al.//*Cancer Cell*,2018

МЕТАБОЛОМНЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ ПРИ ОЖИРЕНИИ: ВЗГЛЯД НА ЛИПОФИЛЬНУЮ ФРАКЦИЮ

А.С. Козлова, С.Н. Тарбеева, А.В. Лисица, Е.В. Ильгисонис

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Ожирение является многофакторным социально значимым заболеванием, которое может поражать всех, независимо от пола, возраста и национальности. Наследственность определяет вероятность развития этого заболевания. Несмотря на то, что образ жизни влияет на ожирение, мало кто готов признать неправильное пищевое поведение, которые широко распространены в быстром ритме жизни в больших городах. Большинство людей не в состоянии оценить долгосрочные последствия бессознательных действий, незаметно переходящих в привычку. Диагностировать ожирение не составляет труда, но существуют серьезные трудности в выработке рекомендаций без существенных изменений образа жизни и моделей поведения. Обнаружить указанную проблему помогает метаболомика, исследование метаболом плазмы крови как зеркала пищевого поведения, образа жизни, а также наследственной предрасположенности и сопутствующих латентных метаболических нарушений. Большая часть метаболома может быть обнаружена с помощью высокопроизводительной технологии - масс-спектрометрии с прямой инъекцией (DIMS) с ионизацией электрораспылением. Однако при использовании метода DIMS некоторые липофильные метаболиты остаются невидимыми. Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (GC-MS) позволяет определить большинство липофильных соединений за счет разделения соединений в образце на фракции. Дополнительное разделение фракций в методе GCxGC-MS повышает информативность выходных данных: таким образом, можно обнаружить больше соединений. Для ортогонального анализа образцов плазмы крови мы сравнили данные, полученные методами DIMS и GCxGC-MS. Повторно используя биоинформационные конвейеры, мы расширили понимание метаболома пациентов с ожирением.

ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ПРИНЦИПОВ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВОГО КОРА В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ

А.А. Лазарева, И.О. Бутенко, Д.С. Матюшкина, В.М. Говорун

НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Искусственная клетка – упрощенная модель живой системы, которая позволит совершать новые открытия как в фундаментальной науке, так и в прикладных исследованиях. На сегодняшний день существует два подхода к созданию синтетической клетки: «снизу вверх» и «сверху вниз». Первый из них направлен на создание простейшего подобия клетки из неживых материалов. Тогда как второй нацелен на упрощение уже существующих клеток с помощью методов геной инженерии. Обе эти стратегии нуждаются в аналитическом инструменте, который позволит заранее определять допустимые диапазоны изменения концентрации тех или иных молекул. Поэтому целью данной работы являлось выявление минимального белкового «кора» живой клетки и анализ его устройства.

Мы использовали наборы протеомных данных, включая результаты MRM анализа *Mycoplasma gallisepticum*, собранные нами, и количественные данные, полученные с помощью shot-gun протеомики другими исследовательскими группами о белках *Escherichia coli* [1], *Bacillus subtilis* [2] и *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Эти данные были обработаны с помощью методов статистики для возможности сравнения внутри датасетов и между ними. А затем проанализированы с помощью алгоритмов машинного обучения, реализованных на языке программирования Python.

В первую очередь был использован корреляционный анализ, результатом которого стали взвешенные белковые графы для всех изученных организмов. Для всех прокариотических организмов мы получили двудольную организацию таких графов, где каждый из кластеров был образован преимущественно положительными связями, тогда как сами кластеры между собой связаны в основном слабыми отрицательными связями. В случае анализа полного протеома *Saccharomyces cerevisiae* мы наблюдали равномерно распределенные белки в одном кластере, на что могла повлиять многокомпонентная организация эукариотической клетки.

Выявление подобных кластеров позволит понять принципы организации живой клетки, а значит, и воспроизвести их в искусственной.

Литература

1. Mori Matteo, et al. (2021) Molecular systems biology. 17,5, e9536.
2. Shi L., et al. (2016) Frontiers in microbiology. 7, 533.
3. Ho Brandon, et al. (2018) Cell systems. 6,2, 192, 205.e3.

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОЛИГОНУКЛЕТИДОВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА ДНК-МИКРОМАТРИЦЕ, ДЛЯ СБОРКИ ГЕНОВ

Т.А. Семашко¹, Д.В. Евсютина¹, Г.Ю. Шевелёв², Г.Ю. Фисун¹, В.М. Говорун¹

¹Институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва; ²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Стоимость стандартно синтезированных олигонуклеотидов для сборки протяжённых фрагментов ДНК на сегодняшний день достаточно велика. При этом существуют работы, в которых предлагается использовать для сборки олигонуклеотиды после высокопроизводительного синтеза на ДНК-микроматрице, однако точность синтеза олигонуклеотидов в таких сложных смесях не была описана детально, и протяжённые фрагменты таким способом так и не были получены. Мы амплифицировали подпулы олигонуклеотидов, необходимые для сборки фрагментов ДНК длиной 1000 п.о., из сложной смеси более чем 2000 олигонуклеотидов. Было показано, что почти все из них имеют целевой продукт в необходимой концентрации и не содержат значительного количества неспецифических продуктов. Пять из амплифицированных подпул олигонуклеотидов были секвенированы на MiSeq до и после обработки ферментами для устранения ошибок синтеза. Было показано, что олигонуклеотиды, синтезированные на ДНК-микроматрице, имеют довольно хорошее качество. Они не содержат большого количества замен или вставок, однако содержат протяжённые негомopolимерные делеции. При этом обработка ферментами для устранения ошибок синтеза на этом этапе не приводит к сильно значимому уменьшению уровня ошибок. Работа выполнена в рамках РФФИ 18-29-08043 (разработка методов) и проекта 1022040800170-3 (синтез целевой последовательности ДНК).

УБИКВИТИН-ЛИГАЗА TRIM29 ИЗМЕНЯЕТ РЕПЕРТУАР САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА TP63

Р.И. Султанов^{1,3}, А.С. Мулюкина², О.А. Зубкова¹, А.И. Федосеева², А.Н. Богомазова¹, К.С. Климина¹, А.К. Ларин¹, Е.И. Шарова², Э.В. Генерозов¹, М.А. Лагарькова², Г.П. Арапиди^{2,3,3}

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России; ³Московский физико-технический институт (государственный университет); ³Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Регуляция развития базального эпителия – сложный процесс, который находится под контролем многих транскрипционных факторов. Один из самых известных – это TP63, транскрипционный фактор белкового семейства p53. Несмотря на долгую историю исследований TP63, его функции остаются не до конца изученными. В отличие от TP53 – TP63 обладает меньшей аффинностью к своему мотиву связывания с ДНК. Необходимая специфичность связывания с регуляторными элементами обеспечивается большим количеством белков-партнеров TP63. Часто, именно белки-партнеры определяют транскрипционную программу TP63.

В предыдущих исследованиях нашей группой был определен новый белок-партнер TP63 – убиквитин лигаза TRIM29. Мы показали, что TP63 и TRIM29 физически взаимодействуют друг с другом в нормальном базальном эпителии предстательной

железы. Более того только в присутствии TRIM29 TP63 активирует пути, ответственные за формирование плотных контактов между клетками. Однако механизм совместной регуляции TP63 и TRIM29 оставался неясным. В этом исследовании мы предположили, что TRIM29 моноубиквитинирует TP63 и тем влияет на выбор мотивов связывания TP63. Методом иммунопреципитации хроматина мы показали, что усиливается связывание TP63 со слабыми мотивами распознавания TP63, которые расположены в энхансерах генов, отвечающих за развитие базального эпителия. Совместный анализ данных убиквитилома базального эпителия легкого и белков-партнеров TRIM29 позволил определить мотив убиквитинирования, специфичный для TRIM29. Исходя из этого мы предсказали, что TRIM29 может убиквитинировать ДНК-связывающий домен TP63 по 267 лизину (267K), который консервативен между TP63 и TP53. Молекулярное моделирование показало, что убиквитинирование TP63 по 267K может стабилизировать связывание TP63 с ДНК.

В этой работе мы попробовали объяснить молекулярный механизм регуляции TRIM29 активности TP63 как транскрипционного фактора. Мы экспериментально показали, что TRIM29 может влиять репертуар мотивов связывания TP63 и предположили, что это обеспечивается убиквитинированием ДНК-связывающего домена TP63. Эти данные в дальнейшем помогут лучше понять роль моноубиквитинирования транскрипционных факторов в регуляции экспрессии тканеспецифичных генов. *Работа поддержана грантом РНФ № 22-75-00129.*

МУЛЬТИОМИКСНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА А НА *ESCHERICHIA COLI* В.А. Шокина¹, Д.С. Матюшкина¹, И.О. Бутенко¹, Я.К. Семи³, И.А. Байчурина², М.Н. Синягина², Т.В. Григорьева², А.А. Круглов³, В.М. Говорун¹

¹НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва; ²Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ³МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва

В организме человека насчитывается около 39 триллионов микробов, которые сосуществуют с нами благодаря симбиозу. Именно в кишечнике животных находится наибольшее число представителей различных классов микробов. Кишечник млекопитающих представляет собой сложную экосистему, состоящую из необычайного количества резидентных комменсальных бактерий, существующих в гомеостазе с иммунной системой хозяина. Одним из факторов, регулирующий отношения между бактериями и хозяином являются секреторные иммуноглобулины класса А (sIgA), которые являются первой линией защиты в просвете кишечника. Известно, что около 75% комменсальных бактерий в кишечнике покрыты sIgA, однако цель этого явления остается до конца не изученной. Одним из представителей комменсальных бактерий эукариот является условно-патогенная бактерия *Escherichia coli*. В тоже время, именно штаммы *E. coli* относят к одним из факторов, вызывающих болезнь Крона. Целью данной работы являлось изучение ответа штаммов *E. coli* MG1655 и пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917 при воздействии на них IgA с помощью мультиомиксных и бактериологических подходов. Специфичность связывания антител с бактериями определялась с помощью иммуноферментного анализа и конфокальной лазерной сканирующей микроскопией. Для исследования физиологического ответа патогенных бактерий на первый иммунный барьер макроорганизма штаммы *E. coli* были обработаны моноклональными IgA в различных концентрациях с дальнейшим масс-спектрометрическим и транскриптомным анализами. Влияние действия IgA на бактерии определяли по способности образовывать биопленки и подвижности с добавлением или без антител. По результатам проведенного протеомного анализа клеток *E. coli* при обработке их IgA антителами с помощью ВЭЖХ-МС был определен ряд белков, представленность которых менялась по сравнению с контролем, что сходилось с результатами, полученными на транскриптомном уровне. Совместная инкубация IgA с *E. coli* Nissle 1917 приводила к увеличению образования бактерией биопленок. По результатам полученных данных, нами выявлены возможные механизмы взаимодействия *E. coli* с IgA. *Работа выполнена в рамках государственного задания НИИ СБМ Роспотребнадзора (тема Разработка методов молекулярно-генетической диагностики для квантификации саиногенеза у здоровых людей).*

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА И ТРАНСЛЯЦИЕЙ В БАКТЕРИЯХ С РЕДУЦИРОВАННЫМ ГЕНОМОМ

Е.А. Цой¹, Г.Ю. Фисунов¹, Д.В. Евсютина¹, И.А. Гаранина, В.А. Манувера², В.М. Говорун¹

¹НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора; ²ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Представители семейства DUF199, к которым относятся WhiA, широко распространены среди грамположительных бактерий. Эти белки состоят из двух доменов, соединенных гибким линкером. Так N-концевой домен (HEN) подобен хоминг-эндонуклеазам, а на C-конце располагается НТН-домен, распространённый среди транскрипционных факторов. О роли WhiA в жизнедеятельности бактерий известно не много. Известно, что в *Bacillus subtilis* он участвует в сегрегации ДНК и делении клеток, а *Streptomyces spp* он задействован в регуляции споруляции. Сохранение WhiA в Молликутах – бактериях с редуцированным геномом, и в синтетическом геноме *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn3.0. указывает на важную роль, которую играет этот белок в жизнедеятельности клеток.

Целью данной работы стало изучение функции белка WhiA в модельных объектах, относящихся к разным группам бактерий (*Bacillus subtilis* и *Mycoplasma gallisepticum*). В ходе нашей работы было определено, что каждый из доменов WhiA способен распознавать и связывать консервативные последовательности в промоторной области оперона, кодирующего рибосомные и несколько других белков (оперон *rpsJ*). При этом, НТН домен образует специфический комплекс с основным мотивом GAYACRCY (Y=C или T, R=A или G), а HEN с дополнительным. Нами было продемонстрировано, что концентрация АТФ и АДФ влияет на родство доменов WhiA (*B. subtilis* и *M. gallisepticum*), к специфическим сайтам связывания. Нами было доказано, что повышение уровня концентрации АТФ приводит к конформационным изменениям белка и диссоциации его от сайта связывания. Из этого можно сделать вывод о том, что WhiA образует петлю обратной связи между энергетическим метаболизмом и трансляцией в *M. gallisepticum*.

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи

3–8 октября 2022

Кроме того, нами были получены штаммы бактерий с сверхэкспрессией и с нокдауном (использовали систему CRISPRi) гена *whiA*. Мы доказали, что снижение экспрессии гена *whiA* приводит к изменению уровня транскрипции генов оперона *rpsJ*. В штаммах с сверхэкспрессией белка достоверных изменений не наблюдалось. Результаты, полученные нами в ходе экспериментов, указывают на то, что изменение уровня экспрессии гена *whiA* не влияет на скорость роста бактерий. *Исследование проведено в рамках госзадания 1022040800170-3 (получение рекомбинантных штаммов).*

БИОТЕХНОЛОГИЯ. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И ПРИЛОЖЕНИЯ

РАЗРАБОТКА И ПРОМЫШЛЕННОЕ ПРОИЗВОДСТВО КОМБИНИРОВАННОЙ ВЕКТОРНОЙ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ВИРУСОМ SARS-CoV-2 Р.А. Хамитов, О.Л. Евдокимова, Е.В. Зуев АО «Генериум»

Использование интраназальных векторных вакцин позволяет оперативно обеспечить формирование коллективного иммунитета путем индукции мукозального иммунного ответа с образованием барьера в верхних дыхательных путях и ротоглотке в условиях массовой вакцинации. Компания АО «ГЕНЕРИУМ» разработала векторную вакцину, представляющий собой инновационную концепцию интраназального введения рекомбинантных вирусных частиц человеческого аденовируса 26 и 5 серотипов (Ad26-S и Ad5-S), несущих ген S-белка SARS-CoV-2, в виде спрея. Использование насадки-распылителя производства Aero Pump GmbH (Германия) позволяет достичь равномерного диспергирования и распределения препарата в верхних дыхательных путях и низкой вероятности попадания в легкие за счет отсутствия частиц менее 10 нм, что обеспечивает должный уровень мукозального иммунного ответа. В ходе работы установлены критические атрибуты качества продукта и оптимизированы аналитические методы для их контроля; выявлены технологические стадии, плохо поддающиеся масштабированию; оптимизирован технологический процесс перед переносом в производство; модифицированы не масштабируемые/нетехнологичные стадии. В результате работы был налажен массовый выпуск действующих веществ обоих компонентов вакцины, позволивший не только обеспечить потребность в иммунопрофилактике COVID-19 в РФ, но и осуществлять поставки данной вакцины в ряд зарубежных стран. Выявлено преимущество интраназального применения вакцины перед внутримышечным по уровню IgA к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2, а бустирование Компонентом II приводит к усилению данного ответа относительно однократного введения Компонента I. Применение вакцины вызывает активацию системного клеточного иммунитета у мышей линии BALB/c в виде преимущественного увеличения CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN- γ , в спленотах мышей, что свидетельствует об активации противовирусного цитотоксического иммунного ответа. В настоящее время вакцина зарегистрирована МЗ РФ (ПУ ЛП-008297 от 04.07.2022) на основании промежуточных данных клинического исследования по изучению не меньшей иммуногенности по сравнению с внутримышечным введением по данным уровня нейтрализующих антител к SARS-CoV-2, определяемых с помощью реакции нейтрализации псевдовирусных частиц вируснейтрализующими антителами. Дизайн клинического исследования учитывает рекомендации ВОЗ по клинической оценке нового способа применения уже зарегистрированных вакцин и воплощает подход с двойным заслеплением групп и использование плацебо для маскировки способа введения исследуемых препаратов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОСЕНСОРА КАК ИНСТРУМЕНТА ИЗУЧЕНИЯ ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА ВАЛИНА В КЛЕТКАХ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

А.А. Самарин, Д.Д. Дербинов, А.С. Дерунец, М.Е. Шереметьева, К.Э. Ануфриев, А.С. Яненко

ГНЦ Институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Создание новых штаммов *Corynebacterium glutamicum*-продуцентов валина при помощи ненаправленного мутагенеза требует быстрого метода анализа множества получаемых вариантов. Таким методом может стать использование внутриклеточного биосенсора, реагирующего на внутриклеточное содержание валина. Биосенсор основан на наличии в клетках *Corynebacterium glutamicum* транскрипционного регулятора Lgr, который активирует транскрипцию гена brnFE при повышенных концентрациях валина. Этот транскрипционный регулятор может быть использован при помощи конструкции, в которой под промотором гена brnFE расположен ген флуоресцентного белка. Таким образом, при повышении концентрации внутриклеточного валина, будет увеличиваться флуоресценция клеток с биосенсором. Была сконструирован плазмидный вектор, содержащий биосенсор на основе Lgr-регулятора. Вектор трансформировали в 8 штаммов, различающихся по продукции валина. Данные проточной цитометрии штаммов с плазмидой pNS2-SV демонстрируют увеличение медианных значений флуоресценции в наиболее продуктивных штаммах. Также в результате опытов была установлена линейная корреляция флуоресценции с увеличением продукции валина. Кроме того, был создан штамм *Corynebacterium glutamicum* KA1 с интегрированной в хромосому конструкцией биосенсора. Полученный штамм KA1 перспективен как инструмент для поиска новых мутаций, влияющих на биосинтез валина.

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЛИНЕЙНЫХ ТРАНСПОРТНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕМБРАННЫХ НАНОТРУБОК

П.В. Башкиров^{1,2}

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА; ²НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва

Зачастую перенос вещества как внутри, так и между клетками осуществляется через просвет мембранных нанотрубок (полых цилиндров), которые могут быть очень маленькими и возникать на короткое время, как те, через которые происходит высвобождение вещества при слиянии синаптического пузырька и плазматической мембраны; или наоборот быть длинными и стабильными формируя внутри- и межклеточную транспортную сеть. Транспортные характеристики нанотрубок (НТ) определяются ее длиной и радиусом просвета. Важно, что стенка НТ представляет собой липидный бислой – материал, обладающий изгибной упругостью. Поэтому мембранные НТ могут деформироваться под действием сил, обеспечивающих перенос вещества, и таким образом адаптироваться к изменяющимся условиям транспорта. Однако роль эластичных свойств мембраны в транспорте остается малоизученной. В данной работе впервые показана взаимосвязь между геометрией НТ и транспортом вещества под действием градиентов электрического потенциала и гидростатического давления. Причем эта соотношения, определяющие эту зависимость, могут быть как линейными, так и сильно нелинейными. Связь между формой стабильной длинной НТ и движущей силой задается латеральным натяжением мембраны, что проявляется в том, что силы намного меньше, чем развиваемое натяжением, вызывают лишь незначительное отклонение профиля НТ, величина которого

го определяется изгибной упругостью мембраны. Когда длина НТ уменьшается до близкого к критическому значению, при котором происходит потеря устойчивости цилиндрической формы, силы, обеспечивающие транспорт, могут индуцировать стохастическое переключение между мембранными трубками с резко различающимися размерами просвета. Такое переключение обратимо и исчезает, как при удлинении трубки, так и при уменьшении движущей вещество силы. Причем переходы могут быть не только стохастическими, но и периодическими с ярко выраженной частотой, которая контролируется электрическим полем посредством электрокапиллярных сил, действующую на упругую стенку НТ. Наряду с установленной параметрической зависимостью вольт-амперной характеристики НТ от упругих свойств мембраны, полученные результаты демонстрирует, что мембранные НТ воплощают в себе нелинейный транспортный элемент, полностью контролируемый механикой мембран и обладающий очевидной биологической и технологической значимостью.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-15-00265.

РАЗРАБОТКА МИКРОБНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПОВЫШЕНИЯ НЕСУЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ГРУНТА В ГРАЖДАНСКОМ СТРОИТЕЛЬСТВЕ

Д.А. Головкина^{1,2}, Е.В. Журишкина^{1,2}, А.А. Кульминская^{1,2} ¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»; ²Курчатовский геномный центр — ПИЯФ, Гатчина

Гражданское строительство подразумевает под собой создание объектов гражданского назначения, которые включают в себя дороги, промышленные предприятия, берегоукрепительные сооружения и т.д. Чаще всего механические свойства природных грунтов оказываются недостаточными для удовлетворения растущих требований в этой области. Решение проблем гражданского строительства обеспечивается устройством однородного, хорошо уплотненного земляного полотна. В настоящее время данную проблему решают за счет химической цементации, но такой подход может негативно сказаться на экологии окружающей среды. Альтернативой данному методу является укрепление грунта при помощи минералообразующих микроорганизмов (биоцементация почвы). Наиболее известным методом биоцементации является микробиологическое осаждение CaCO_3 , где процессы вызваны уреоллизом. В процессе уреоллиза происходит гидролиз мочевины, что вызывает осаждение минералов карбоната кальция, который осаждается в пустотах почвы, тем самым увеличивая ее прочность. Целью данной работы была разработка технологии повышения прочности органического грунта при обработке его суспензиями микроорганизмов. В процессе работы был проведен скрининг микроорганизмов на их способность осаждать кристаллы CaCO_3 , а также были определены параметры pH, накопления биомассы и изменения активности уреазы в процессе роста выбранных бактерий. В ходе работы была подобрана оптимальная среда для уплотнения почвы (1М мочевины и 0,5 М CaCl_2). В качестве метода внесения рабочего раствора был выбран метод пролива, а также метод биоувеличения почвенной микрофлоры. Отобранные штаммы бактерий были проверены на их способность увеличивать прочностные характеристики органического грунта. Были исследованы 3 типа грунта, взятых из разных точек Ленинградской области на их способность выдерживать нагрузку и на количество образовавшегося карбоната кальция. Лидером по выбранным параметрам стал бактериальный *Mix*, который содержал взятые ранее бактерии. На данный момент ведутся работы по масштабированию эксперимента в полевые условия. *Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075-15-2019-1663.*

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ ИЗ Т-ЛИМФОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ИНДУКЦИИ

Е.А. Змиевская¹, С.А. Мухаметшин¹, А.Х. Валиуллина¹, И.И. Ганеева¹, А.А. Ханнанов², Э.Р. Булатов^{1,3}

¹Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, Казань; ²Химический институт им. А.М. Бутлерова, Казанский федеральный университет, Казань; ³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Микровезикулы (МВ) относятся к подгруппе внеклеточных везикул, секретируемых большинством клеток организма. Они активно изучаются как бесклеточные биоподобные препараты и средства доставки лекарств. Исследуется множество способов индукции образования МВ – естественных (пассивная секреция, активация клеток) и стрессовых (гипоксия, механическое и химическое воздействие и др). Первичная культура Т-лимфоцитов активировалась CD3/CD28 антителами с последующей экспансией. Часть клеток была повторно активирована. Для химической индукции образования МВ применялся цитохалазин В (ЦХВ). Как физический индуктор применялся ультразвук (УЗ). Полученные МВ очищались последовательным центрифугированием. Далее образцы исследовались методами иммуноблоттинга и анализа траектории наночастиц (АТН). Методом АТН определена концентрация МВ (для всех образцов порядка 10⁸ частиц/мл) и дисперсность размера частиц. Обнаружено, что индукция МВ активацией антителами, обработкой ЦХВ или УЗ увеличивает монодисперсность частиц, не влияя на их средний размер. Применение УЗ к активированным клеткам привело к уменьшению монодисперсности и появлению фракции более крупных МВ (до 700 нм). В результате вестерн-блот анализа выявлено относительное повышение уровня CD3 в образцах естественных МВ, а также МВ, индуцированных активацией и УЗ по сравнению с клеточным контролем. В образцах, полученных УЗ, выявлено повышение содержания гранзима В. В МВ, индуцированных ЦХВ, указанных белков не обнаружено. При равном количестве общего белка отмечено снижение содержания бета-актина в ряду клетки > естественные МВ > индукция УЗ > индукция ЦХВ. Данное наблюдение может объясняться изменением соотношения «цитоплазма/мембрана» из-за большой разницы в размере клеток и МВ (10 мкм и 0,1 мкм, соответственно), а также механизмом действия ЦХВ (ингибирование синтеза актиновых филаментов). Все исследованные способы индукции, кроме ЦХВ, позволяют получить МВ, несущие функционально значимые молекулы Т-лимфоцитов. Необходимо дальнейшее исследование структуры и функций получаемых данными методами МВ. *Работа выполнена за счет средств гранта РФФ 19-74-20026, при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).*

НОВЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ КОРМОПРОИЗВОДСТВА

И.Н. Зоров, В.Ю. Кислицин, О.Г. Короткова, Ю.А. Денисенко, И.А. Шашков, А.П. Синицын

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Моногастричные животные, в силу особенностей пищеварения практически не могут разрушать межклеточные стенки зерновых компонентов, содержащие в своем составе различные некрахмальные полисахариды (целлюлозу, ксилан, пектин и тд), НПС, в связи с чем особую актуальность приобретает использование комплексных ферментных добавок в рационах этих видов животных. Применение ферментных препаратов (ФП) снижает вязкость кормовых масс (химуса) в подвздошной кишке, что позволяет животным лучше переваривать жиры, аминокислоты и минеральные компоненты. Как правило, основными компонентами кормовых добавок являются β -глюканазы различной специфичности и ксиланазы, активные в нейтральных и слабощелочных диапазонах pH. Другой проблемой при кормлении с/х животных и птицы является недостаток фосфора, составляющий основу костной ткани, нуклеиновых кислот, фосфолипидов, молекул-энергосносителей. Особенно остро нуждается в фосфоре молодняк, в частности бройлеры. Однако, фосфор, в виде фитиновой кислоты и ее солей – фитатов, усваивается взрослой птицей на 50, а молодняком лишь на 30 процентов. Фитаза переводит связанный, неусвояемый фосфор зерна в доступную для усвоения форму, увеличивает доступность энергии, протеина, макро- и микроэлементов из зерновых, жмыхов и шротов. Таким образом, объединение основных ферментативных активностей в комплексных ФП позволяет решать сразу несколько проблем промышленного животноводства и птицеводства. Поставленная задача была успешно решена с использованием экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum* 537. На ее основе получены комплексные ФП, содержащие фитазу/ксиланазу и фитазу/ β -глюканазу. Общая продуктивность рекомбинантных штаммов составила 60 г/л белка, содержание целевых комплексов – 60-70%. Ферментативные активности для новых комплексных ферментных препаратов составили 5000 ед/г для фитазы (по фитату натрия) и по 2500 ед/г для β -глюканазы (по β -глюкану) и ксиланазы (по ксилану бука) для ФП PhyEG и PhyXu1, соответственно.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2021-1071 от 28.09.2021).

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ВОДОРΟΣЛЕЙ И ЛИШАЙНИКА НА МИКРОБИОМ СИМБИОТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ SCOBY

И.М. Лапина^{1,2}, Д.А. Головкина^{1,2}, Е.В. Журишкина^{1,2}, А.Е. Комиссаров¹, Ф.К. Ермилов¹, А.М. Барсегян¹,

А.А. Кульминская^{1,2} ¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт» Гатчина; ²Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина, Россия

Стремление к здоровому образу жизни подразумевает обогащение рациона продуктами здорового питания. В последние десятилетия особую популярность в мире приобрёл напиток «комбуча» – освежающий напиток, который является конечным результатом ферментации чая путем добавления закваски бактерий и дрожжей под названием SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast). Характерный микробиом чайного гриба включает несколько родов уксуснокислых бактерий, дрожжей, а также молочнокислых бактерий. Для придания ферментированным напиткам на основе комбучи дополнительных полезных свойств активно используют как альтернативное сырьё для ферментации чайного гриба, так и разнообразные добавки к чаю. Перспективными компонентами для функциональных продуктов питания являются экстракты из бурых водорослей, содержащие ряд биологически активных соединений: полисахариды, полифенолы, белки, минералы, витамины, жирные кислоты. В целом, компоненты бурых водорослей характеризуются как обладающие иммуномодулирующей, антимикробной и противовоспалительной активностью. Также интерес представляют экстракты из лишайников, которые традиционно используются в народной медицине. Основными компонентами состава водного экстракта Исландского мха (*Cetraria islandica*) являются бета-глюканы, органические кислоты и микроэлементы. Экстракты лишайника проявляют иммуномодулирующую, противомикробную и противовоспалительную активность. При использовании новых материалов для ферментации чайного гриба вводятся новые химические соединения, активность которых в отношении SCOBY до конца не известна. Поэтому данные исследований по селекции штаммов микроорганизмов, присутствующих в SCOBY, и их адаптации к новой среде ограничены и представляют собой перспективу дальнейших исследований.

В нашем исследовании мы рассматриваем, как введение в состав ферментируемого чая таких добавок, как экстракт бурых водорослей *Fucus vesiculosus*, экстракт лишайника *Cetraria islandica*, а также смеси этих экстрактов, влияет на микробиом симбиотической культуры SCOBY, а также на свойства полученных напитков.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня. Соглашение No. 075-15-2019-1663.

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

А.М. Рожкова, А.М. Чулкин, И.Г. Синельников, И.А. Шашков

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Использование микроорганизмов для производства ферментов и ферментных комплексов является традиционной практикой для биотехнологических производств. Основу большинства коммерческих ферментных препаратов крупнейших фирм-производителей (Dupont, DSM, Novozymes, AB Enzymes и др.) составляют высушенные секретлируемые жидкости (СЖ) высокопродуктивных мицелиальных грибов родов *Trichoderma* sp, *Aspergillus* sp, *Penicillium* и тд. Управляемая коррекция состава СЖ является важной задачей современной биотехнологии, выполняемой при помощи различных подходов геномного редактирования, в том числе методом CRISPR/CAS. Продуктивность гриба *P. verruculosum* (до 60 г/л общего белка) позволяет использовать его в качестве платформы для получения ряда промышленных ферментных препаратов, применяемых в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства. Однако, при экспрессии гетерологичных генов целевых ферментов реципиентным штаммом *P. verruculosum* 537, в процессе культивирования наблюдается секреция собственных протеаз реципиента, которые либо частично деградируют гетерологичные ферменты, либо отщепляют целлюлозосвязывающий

домен у целлюлозгидролазы I (ЦБГ1) - основного компонента целлюлозного комплекса *P. verruculosum*, обеспечивающего деструкцию кристаллической целлюлозы. Таким образом, экспрессия гомологичных протеаз ограничивает возможность использования *P. verruculosum* как биофабрики для производства ферментов. Ранее для *P. verruculosum* была адаптирована методика CRISPR/Cas9 нокаутов однокопийных генов. Для этого была выбрана схема редактирования с синтезом нуклеазы Cas9 и sgRNA в грибной клетке. Для транскрипции гена cas9 был выбран конститутивный промотор *gpdA*, а для транскрипции sgPHK – промотор 5S рPHK. В данной работе методом CRISPR/Cas9 получен протеаз-дефицитный реципиентный штамм с пониженной экспрессией протеолитических ферментов, что привело к сохранению каталитической активности целевых ферментов в СЖ рекомбинантных штаммов и повысило качество получаемых ферментных препаратов. Эффективность нокаутов транскрипционных факторов в грибе *P. verruculosum* методом CRISPR/Cas9 составило 25-50%, что соответствует литературным данным для других мицелиальных грибов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (Соглашение № 22-24-00997).

ПОИСК НОВЫХ ТОЧЕК ДЛЯ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ В ГЕНОМЕ *KOMAGATAELLA PASTORIS*

И.Г. Синельников¹, Ю.А. Денисенко¹, О.А. Синицына¹, Л.А. Щербакова²

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²ВНИИ фитопатологии

Дрожжи *Komagataella pastoris* широко используются в качестве организма-хозяина для производства гетерологичных белков и ферментов. Одним из основных направлений по улучшению штаммов является обеспечение высокого уровня транскрипции гетерологичного гена при помощи различных промоторов и увеличения числа интеграций экспрессионной кассеты в геном. На сегодняшний день высококопийные интегранты *K. pastoris* достижимы только скринингом случайных событий или клонированием конкатемеров генов. Следовательно, необходимо разрабатывать способы быстрой и удобной интеграции множественных копий экспрессионной кассеты. Одной из наиболее эффективных стратегий многокопийной интеграции является интеграция экспрессионной кассеты в области генома, представленные виде множества копий, однако большинство генов дрожжей представлены в виде одной копии. Основной целью работы являлся поиск новых точек интеграции в геном *Komagataella pastoris* и тестирование возможности использования их для получения многокопийных штаммов продуцентов, а также оценки влияния положения гена в геноме на уровни транскрипции. На первом этапе работы в трех геномах *K. pastoris* (штаммы ATCC 28485, X-33, GS-115) при помощи хеш-алгоритмов и программного обеспечения REpeat Detector были определены участки длиной не менее 1000 п.о. и имеющих гомологию между собой не менее 90%. Было обнаружено от 18 до 24 гомологичных участков на концах хромосом, которые представляли собой участки 18 и 28S рPHK, разделенные ITS регионами, так же на 2 и 4 хромосоме были найдены 8 участков гомологии имеющие сходство с генами агглютинации дрожжей *S. cerevisiae*. Найденные участки были протестированы как мишени для гомологичной рекомбинации. При интеграции в участки 18S рPHK, удалось получить штамм, содержащий 16 копий экспрессионной кассеты, при этом более 32% всех трансформантов содержали более 5 копий экспрессионной кассеты. Трансформация в область, кодирующую белок агглютинации, позволяла встраивать от 3 до 8 копий экспрессионной кассеты, однако наблюдались фенотипические изменения - замедленный рост и дефекты клеточной стенки. В результате показано, что гомологичная рекомбинация по 18S рPHK, позволяют получать высококопийные штаммы продуценты за один этап трансформации.

Исследование выполнено за счет гранта РФ №22-16-00153.

ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ ИЗОЛЯТОВ *PANTOEA BRENNERI*

А.Д. Сулейманова Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Нерастворимые фосфаты широко распространены в окружающей среде и являются малодоступными для растений соединениями, аккумулирующими фосфор. Известно, что фосфаты удобрений адсорбируются и осаждаются в первую очередь катионами Ca²⁺ и Al³⁺. Ранее из проб почвы республики Татарстан нами были выделены штаммы *Pantoea brenneri*. Было установлено, что штаммы обладают множественной PGP-активностью: способны к синтезу аммиака и цианидов, обладают протеолитической, хитиназной и целлюлазной активностей, синтезируют фитогормоны и сидерафоры, ингибируют рост фитопатогенных микроорганизмов. На данном этапе работы определяли способность штаммов к мобилизации почвенных фосфатов. Исследование проводили методом посева на селективные питательные среды: NBRIP, содержащую нерастворимый фосфат кальция или фосфат алюминия и PSM, содержащую фитат кальция в качестве единственного источника фосфора. Установлено, что все четыре исследуемых штамма *P. brenneri*, способны расти и образовывать зоны гидролиза на средах с фитатом и фосфатом кальция, но не алюминия. Считается, что фосфат кальция мобилизуется микроорганизмами лучше, чем другие нерастворимые фосфаты, поскольку в этом процессе значительную роль играет снижение pH среды, в то время как при растворении фосфатов железа и алюминия важны процессы хелатообразования с участием анионов, преимущественно, ди- и трикарбонатов кислот. Вероятно, в связи с этим, на среде, содержащей фосфат алюминия в качестве единственного источника фосфора, гало-зон обнаружено не было. Фитаты в почве являются не только резервуаром фосфора, но и связывают значительную часть микроэлементов, превращая их в комплексные нерастворимые конгломераты. Таким образом, исследуемые соединения, будучи потенциальными источниками макро- и микроэлементов для живых организмов, составляют нерастворимую фракцию почвы и являются потенциальным объектом для создания новых микробных биотехнологий для их утилизации. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана грантом РФ (проект № 21-76-000170).

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА TGF- β 3 НА ЭКСПРЕССИЮ ОСНОВНЫХ ГЕНОВ ХОНДРОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

Д.М. Марченко¹, М.С. Божокин^{1,2}, Е.Р. Михайлова¹, С.А. Божкова², М.Г. Хотин¹

¹Институт цитологии РАН; ²НМИЦ травматологии и ортопедии им. Вредена, Санкт-Петербург

Известно, что гиалиновый хрящ, покрывающий поверхности крупных суставов, обладает ограниченной способностью к регенерации и даже небольшие его дефекты приводят к дальнейшей деградации ткани. Следовательно, вопрос восстановления гиалинового хряща является актуальным для миллионов людей в мире. Одним из способов решения данной проблемы является использование клеточно-инженерных конструкций (КИК), которые представляют собой модифицированную клеточную культуру, помещенную внутрь биodeградируемого носителя (скаффолда). В качестве клеточной культуры перспективно использование аллогенных клеток, например дермальных фибробластов. Их преимуществами являются доступность, стандартизируемость и неиммуногенность. При этом необходимо модифицировать фибробласты именно в хондрогенном направлении, например, с помощью рекомбинантных белков – индукторов хондрогенеза. В качестве рекомбинантного белка мы выбрали TGF- β 3, важнейший цитокин в процессе хондрогенеза. Мы исследовали влияние рекомбинантного белка TGF- β 3 на экспрессию генов хондрогенеза в культуре дермальных фибробластов человека. Клеточная культура линии DF2 была получена из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» ИИЦ РАН. Фибробласты модифицировали путём добавления в среду рекомбинантного белка TGF- β 3 концентрацией 10 нг/мл. Клетки инкубировали в течение 7 и 14 дней в стандартных условиях. Оценку эффективности модификации анализировали по мере изменения экспрессии генов, ответственных за хондрогенез (Tgf- β 3, Sox9, Col2a1, Acan, Comp) относительно экспрессии гена домашнего хозяйства (Gapdh) с помощью метода ПЦР в реальном времени. Значения экспрессии генов оценивали в терминах кратной индукции по отношению к контрольной клеточной популяции при помощи метода $-\Delta\Delta Ct$. В результате мы выяснили, что добавление в среду рекомбинантного белка TGF- β 3 незначительно увеличивает экспрессию гена Comp, кодирующего белок неколлагенного внеклеточного матрикса гиалинового хряща. Однако данный результат требует дополнительных исследований. На экспрессию остальных анализируемых генов в дермальных фибробластах добавление рекомбинантного белка TGF- β 3 статистически значимо не повлияло. Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ по проекту 15.БРК.21.0011 (Соглашение № 075-15-2021-1063).

УЧАСТИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТ ВНЕКЛЕТОЧНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО МАТРИКСА В ПРОЦЕССЕ БИОМИНЕРАЛИЗАЦИИ

Л.А. Иванова^{1,2}, А.Д. Япрынцева³, А.Е. Баранчиков³, Н.В. Цвигун⁴, Я.А. Забродская⁵, В.В. Егоров^{1,2}, Д.В. Лебедев¹, А.А. Кульминская^{1,2}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

²Курчатовский геномный центр, НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина; ³Институт общей

и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва; ⁴Институт кристаллографии и фотоники им. А.В. Шубникова РАН, Москва; ⁵НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург

Биоминерализация — явление минералообразования живыми организмами — широко распространено в природе. В ходе метаболических реакций различные бактерии индуцируют осаждение карбоната кальция в почве и горных породах или образуют инкрустированные биопленки, закупоривающие мочевые катетеры, что создает значительные проблемы в клинической практике [1]. Исследования механизмов биоминерализации важны для решения клинических задач по торможению кристаллизации кальцита, а также для применения новых технологий восстановления бетонных конструкций, обеспечивающих целостность пористых сред, гидравлический контроль и восстановление окружающей среды [2, 3, 4]. Несмотря на обширные исследования в области биоминерализации, до сих пор не показана роль отдельных макромолекулярных компонент внеклеточного матрикса (ВКМ) в этом процессе, хотя оба этих процесса проходят в бактериальном сообществе параллельно, влияя друг на друга.

В настоящей работе с помощью ряда физических методов: СЭМ, РФА и ИК-спектроскопии была показана эволюция структуры образованных преципитатов CaCO₃ бактерией *B. cereus* на разных стадиях формирования ВКМ в планктонной культуре; с использованием микроскопических методов: световой, атомно-силовой и конфокальной микроскопии со специфическими флуоресцентными красителями был подробно показан процесс образования нерастворимых осадков CaCO₃, а также показана роль отдельных компонентов ВКМ (внеклеточной ДНК, амилоидов и полисахаридов) в процессе кристаллизации биогенных минералов. Ключевая роль ДНК-компоненты ВКМ в процессе биоминерализации *B. cereus* была показана в эксперименте с ДНКазой I. Работа выполнена при финансовой поддержке «КГЦ – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075-15-2019-1663

Литература

1. Yuan F., Huang Z., Yang T., Wang G., Li P., Yang B., Li J. 2021 Pathogenesis of *Proteus mirabilis* in catheter-associated urinary tract infections. *Urol Int* 105:354-361.
2. Dhami N.K., Reddy M.S., Mukherjee A. 2014. Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages. *Front Microbiol* 5.
3. Le Métayer-Levrel G., Castanier S., Oriol G., Loubière J.-F., Perthuisot J.-P. 1999. Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sediment Geol* 126:25–34.
4. De Muynck W., De Belie N., Verstraete W. 2010. Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecol Eng* 36:118–136.

БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

STN7 КИНАЗА И ПЕРОКСИД ВОДОРОДА – РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ПОГЛОЩЕНИЯ КВАНТОВ СВЕТА ВЫСШИМИ РАСТЕНИЯМИ

Д.В. Ветошкина, Н.В. Балашов, Н.Н. Руденко, И.А. Найдов, М.М. Борисова-Мубаракшина

Институт фундаментальных проблем биологии РАН обособленное подразделение ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино

Свет является ключевым фактором, поддерживающим жизнь фотосинтезирующих организмов. Частые колебания освещенности привели к развитию в фотосинтезирующих организмах различных адапционных механизмов. Эти механизмы развиваются в короткие и длительные сроки в зависимости от условий освещенности и влияют на размер антенны либо обеих фотосистем, либо только фотосистемы II (ФСII), соответственно. При появлении освещенности происходит запуск быстрого адапционного ответа – state transitions, который заключается в миграции части светособирающей антенны ФСII от ФСII к ФСI. Необходимым этапом для протекания state transitions является фосфорилирование белков светособирающей антенны ФСII STN7 киназой. Длительное повышение освещенности приводит к запуску другого адапционного механизма, заключающегося в подавлении биосинтеза мажорных светособирающих белков ФСII, что приводит к уменьшению размера светособирающей антенны ФСII и, таким образом, защищает фотосинтетический аппарат от фотоингибирования. Многократно высказывались предположения о возможной взаимосвязи между state transitions и долговременной регуляцией размера светособирающей антенны ФСII. В роли связующих компонентов между этими процессами могут быть рассмотрены STN7 киназа и пероксид водорода. Ранее нами была показана сигнальная роль пероксида водорода в долговременной адаптации. В работе проведено исследование роли STN7 киназы в долговременной адаптации светособирающей антенны ФСII к повышенной освещенности. Впервые показано, что в растениях без STN7 киназы не происходит адапционного уменьшения размера антенны ФСII. Таким образом, было показано, что в долговременную адаптацию включен не только пероксид водорода, но и STN7 киназа. Одним из механизмов регуляции STN7 киназы является окисление/восстановление сульфгидрильных групп цистеинов. Известно, что основной мишенью пероксида водорода в белках являются цистеины. Для проверки предположения о прямом влиянии пероксида водорода на STN7 киназы проводили оценку влияния добавок пероксида водорода к изолированным тилакоидам на фосфорилирующую активность STN7 киназы. Впервые было показано ингибирование активности данной киназы пероксидом водорода. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-10088, <https://rscf.ru/project/22-74-10088/>*

АМИЛОИДНЫЕ БЕЛКИ РАСТЕНИЙ И СИМБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ: РАЗНООБРАЗИЕ И ФУНКЦИИ

А.А. Нижников^{1,2}

¹ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии; ²Санкт-Петербургский государственный университет

Амилоиды представляют собой фибриллярные белковые агрегаты, обладающие особой упорядоченной структурой, придающей им устойчивость к различным воздействиям, и уникальные физико-химические свойства. Наиболее хорошо амилоиды известны благодаря их связи с развитием приблизительно 50 заболеваний человека и животных, большинство из которых неизлечимы или трудно поддаются лечению. Начиная с 2000 года было опубликовано значительное число работ, показывающих роль амилоидов в контроле жизненно-важных функций у различных организмов, представляющих все три домена живого мира. Тем не менее, функциональные амилоиды не были известны у растений, а также у бактерий-микросимбионтов растений. В настоящем докладе рассмотрены данные, касающиеся недавнего открытия амилоидных белков у растений, их биологических функций, а также влияния на пищевую ценность семян растений. Также мы обсуждаем особенности структуры амилоидных белков симбиотических клубеньковых бактерий порядка Rhizobiales и функциональной роли этих амилоидных белков в контроле надорганизменных взаимодействий «симбионт-хозяин». В завершающей части доклада рассмотрены общие особенности структуры белков растений и бактерий, способных образовывать амилоиды *in vivo*, включая наличие у них доменов типа «бета-баррель», а также взаимное влияние этих белков на агрегацию и амилоидогенез друг друга. *Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-320 от 20.04.2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».*

ВЛИЯНИЕ ОТСУТСТВИЯ ТИЛАКОИДНОЙ α -КАРБОАНГИДРАЗЫ 2 НА STATE TRANSITIONS В РАСТЕНИЯХ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Е.М. Надеева, Л.К. Игнатова, Н.Н. Руденко, Д.В. Ветошкина, Б.Н. Иванов

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» – обособленное подразделение Института фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино

«State transitions» (ST) представляет собой механизм акклимации, который регулирует поглощение энергии возбуждения между двумя фотосистемами (ФС) с помощью изменения размера их светособирающих комплексов (ССК). При предпочтительном возбуждении ФС2 (синим или красным светом), взаимодействие пластогидрохинона с хинолоксилирующим сайтом активирует STN7 киназу, которая фосфорилирует подвижные тримеры ССК ФС2. Фосфорилирование белков приводит к их диссоциации от ФС2 и миграции к ФС1 (состояние 2). При окислении пула пластохинона происходит инактивация STN7 киназы, а конститутивно активная фосфатаза TAP38 дефосфорилирует тримеры ССК ФС2, что приводит к их диссоциации от ФС1 и повторной ассоциации с ФС2 (состояние 1). Ранее нами показано, что отсутствие в растениях *Arabidopsis thaliana* тилакоидной α -карбоангидразы 2 (α -КА2), катализирующей реакцию $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$, приводит к меньшему восстановлению пула пластохинона и большей скорости электронного транспорта по сравнению с растениями дикого типа (ДТ).

С помощью измерения спектров низкотемпературной флуоресценции мы оценивали способность растений осуществлять переход в состояние 2 ST. В растениях дикого типа (ДТ) происходило изменение отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 на 22%, а в мутанте по α -КА2 на 8-13%, после инициации ST освещением по сравнению с значениями, полученными после адаптации к темноте. Процесс ST – один из механизмов нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (НФТ) и может быть также оценен по релаксации NPQ после выключения света. Таким образом можно оценить способность растений возвращаться в состояние 1 ST. Между 15-ой и 24-ой мин (ST-зависимая релаксация) после выключения действующего красного света, преимущественно возбуждающего ФС2 величина NPQ в мутанте по α -КА2 оказывалась в 2 раза ниже, чем в листьях растений ДТ. Таким образом, обнаружена более низкая способность мутантных растений с заблокированным синтезом α -КА2 осуществлять ST по сравнению с растениями ДТ. Уровень экспрессии генов *lhcb1* и *lhcb2*, кодирующих белки ССК ФС2 в мутанте по α -КА2 был выше, чем в растениях ДТ. Вестерн-блот анализ показал, что и содержание белков *lhcb1* и *lhcb2* в мутанте было на 20-30% выше, чем в ДТ. Работа поддержана грантом РФФИ № 22-74-10088.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЗАПАСАНИЕ ЛИПИДОВ И КРАХМАЛА У ЗЕЛеноЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *COELASTRELLA SP.* IPPAS H-626

Е.В. Заднепровская¹, А.А. Крапивина¹, М.А. Синетова¹, С.И. Аллахвердиев^{1,2}

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва; ²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино

Зеленые микроводоросли на протяжении многих лет культивируются для получения ценных биологических соединений: каротиноидов, белков, крахмала, целлюлозы, жирных кислот и т.д. Интересны в этом плане липиды, которые могут быть использованы для создания биотоплива третьего поколения, а также в качестве медицинских препаратов и косметических средств. В связи с этим исследование микроводорослей, синтезирующих липиды, и поиск наиболее продуктивных штаммов – основная задача в изучении одноклеточных водорослей. Цель исследования – изучение влияния азотного и магниевого голодания на накопление липидов и крахмала клетками зеленой микроводоросли *Coelastrella sp.* IPPAS H-626. Объектом изучения является зеленая микроводоросль *Coelastrella sp.* Chod. штамм IPPAS H-626 (коллекция IPPAS ИФР РАН им. К.А. Тимирязева, Москва). Культивирование проводилось в течение трех суток на модифицированной среде Тамия 1/2, Тамия-N, Тамия-Mg в сосудах при следующих условиях: температура – 30°C, освещенность – 110 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹, аэрация стерильной газовой смесью, обогащенной CO₂ (1,5-2%). Взятие проб осуществлялось в начале культивирования, а также через 24, 48 и 72 часа. Визуально определяли наличие липидов с помощью флуоресцентной микроскопии (флуоресцентный краситель Bodipy 505/515 (Thermo Fisher Scientific, США) с конечной концентрацией 5 мкг/мл). Наличие крахмала определялось с помощью световой микроскопии, окрашивание раствором люголя (10%). При азотном голодании культура бледнеет (признаки хлороза), замедляется в росте: прирост сухой массы практически в два раза ниже контрольной культуры. Клетки приобретают округлую форму за счет активного накопления ТАГ и большого количества крахмала, оболочки утолщаются. При отсутствии магния в среде показатели роста и оптической плотности культуры не отличаются от контрольных образцов; наблюдается активное накопление крахмала (в 1,4 и 2,3 раза больше по сравнению с азотным голоданием и контролем, соответственно). Клетки веретенообразной формы с толстыми клеточными стенками, накапливают некоторое количество ТАГ. Результаты получены в рамках государственного задания Минобрнауки и высшего образования Российской Федерации (121033000136-14) и при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-44-08001).

ТРЕХМЕРНЫЕ СТРУКТУРЫ В БАЗЕ ДАННЫХ СТРУКТУР УГЛЕВОДОВ

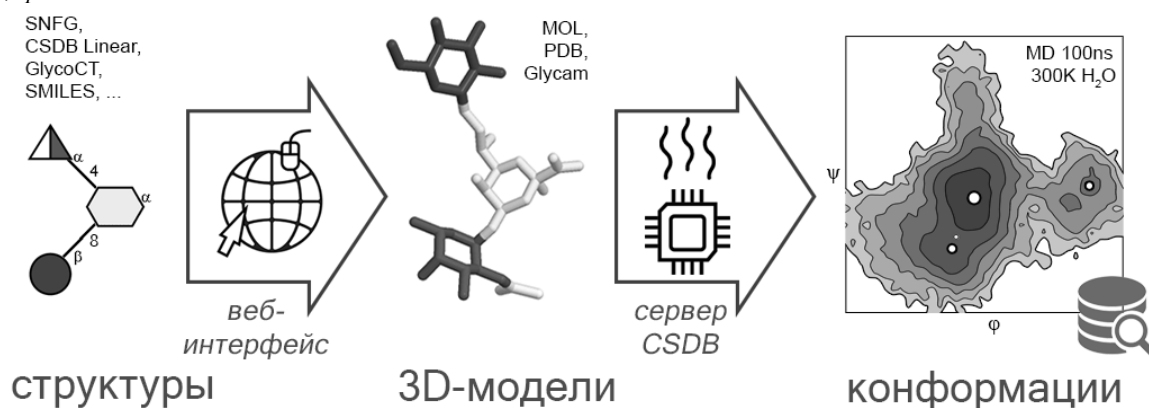
Ф. Тоукач¹, А. Бочков², С. Щербинина¹, В. Строилов¹

¹Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва; ²ЕРАМ Украина, Киев, Украина

База данных углеводных структур (CSDB) [1] представляет собой платформу гликоинформатики и базу данных природных углеводов и связанных с ними знаний. Растущий интерес к трехмерным структурным данным в гликонауке способствовал развитию новых сервисов на основе CSDB. Они включают онлайн-редактор SNFG, генератор начальных геометрий и базу данных конформационных карт.

Онлайн-редактор [2] позволяет формировать углеводы и их производные с помощью интуитивно понятных визуальных операций с элементами в стиле SNFG. Он поддерживает большинство структурных особенностей природных гликанов и гликоконъюгатов и имеет конвертеры в несколько гликоинформатических и химических форматов, включая модели на атомарном уровне. Генератор начальных геометрий [3] использует предварительно рассчитанные конформации мономеров и связей и создает в браузере оптимизированные трехмерные модели и файлы PDB/MOL. Если в структуре гликана присутствуют неопределенности, генерируются все возможные структурные и пространственные изомеры.

Конформационный модуль [4] представляет собой базу данных, в которой хранятся конформационные карты межсоставных связей в олигосахаридах и конъюгатах в размерности от 1 до 4. Он заполняется из молекулярно-динамических траекторий, непрерывно рассчитываемых на сервере CSDB. Специальное сравнительное исследование методов молекулярного моделирования углеводов [5], выявило, что использованный метод (100 нс, ММ3, 300К, явная вода) в наибольшей степени подходит для этой цели. Валидация метода была проведена с помощью анализа трансгликозидных ядерных эффектов Оверхаузера. Интерфейс базы конформаций имеет структурный поиск и другие фильтры, а также интерактивный инструмент для манипулирования конформационными картами и их экспорта. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант 18-14-00098-П.



1. Toukach, PV; Egorova, KS (2016) Carbohydrate Structure Database merged from bacterial, archaeal, plant and fungal parts. *Nucleic Acid Res.*, 44(D1), D1229.
2. Bochkov, AY; Toukach, PV (2021) CSDB/SNFG Structure Editor: an online glycan builder with 2D and 3D structure visualization. *J. Chem. Inf. Model.*, 61(10), 4940.
3. Chernyshov, IY; Ph.V. Toukach, PV (2018) RESTLESS: automated translation of glycan sequences from residue-based notation to SMILES and atomic coordinates. *Bioinformatics*, 34(15), 2679.
4. Scherbinina, SI; Frank, M.; Toukach, PV (2022) Carbohydrate Structure Database (CSDB) oligosaccharide conformation tool. *Glycobiology*, 10.1093/glycob/cwac011.
5. Stroylov, VS; Panova, MP; Toukach, PV (2020) Comparison of methods for bulk automated simulation of glycosidic bond conformations. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(20), 7626.

ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛИСАХАРИДОВ В ПОВЫШЕНИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СРЕДСТВ

И.М. Ермак¹, Н.В. Крылова²

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; ²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток

Противовирусная активность полисахаридов, предотвращающих проникновение ДНК- и РНК-содержащих вирусов в клетку и тем самым блокирующих распространение вирусной инфекции, хорошо известна. Приведён анализ литературных и собственных данных по противовирусной активности сульфатированных полисахаридов, основным механизмом которого, по мнению многих исследователей, является прямое связывание полисахаридов, как природных миметиков ключевых рецепторов клеток - гепарансульфатов, с поверхностью вирусных частиц. Сульфатированные полисахариды каррагинаны (КР), выделенные из красных водорослей российского тихоокеанского побережья, проявляют различный спектр противовирусной активности, что продемонстрировано в отношении вируса простого герпеса (ВПГ), репликационно-некомпетентных лентивирусных векторов на основе ВИЧ-1 и подтверждено данными компьютерного моделирования. Ингибирование инфекцион-

ной активности вируса полисахаридами, исследованное по их действию на разные стадии репликации вируса, показало зависимость противовирусной активности КР как от их структурных особенностей, так и макромолекулярной организации. Показана перспективность использования КР в качестве мукоадгезивной матрицы для усиления антигерпетической активности известных противовирусных препаратов, включенных в полисахарид. Так, при включении в КР матрицу антиоксиданта эхинохрома (ЭХ), обладающего высоким вирулицидным действием в отношении ВПГ-1 и образующего с КР комплекс, наблюдается эффект синергизма, что способствует более эффективному связыванию КР/ЭХ комплекса с оболочечными белками ВПГ-1, препятствуя прикреплению и проникновению вируса в клетки-мишени. Анализ влияния КР/ЭХ на жизненный цикл ВПГ-1 выявил способность комплекса повышать устойчивость клеток к заражению; оказывать непосредственное влияние на вирусные частицы, снижая их способность заражать клетки; подавлять ранние стадии репликации вируса. Комплекс КР с антигерпетическим препаратом - Ацикловиром, повышает устойчивость клеток к инфицированию ВПГ-1 и подавляет ранние стадии репликации вируса при низкой концентрации действующего препарата. Комбинированное применение КР и Ацикловира, как соединений с разными механизмами противовирусного действия, определяет перспективность их возможного комплексного использования при герпесвирусных инфекциях.

ПОЛУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ ПОЛИСАХАРИДА КСАНТАНА

Е.В. Журишкина^{1,2}, С.В. Швецова^{1,2}, Е.В. Энейская¹, А.И. Титов¹, А.А. Кульминская^{1,2}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт» Гатчина;

²Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина

Ксантан представляет собой внеклеточный гетерополисахарид, продуцируемый бактериями рода *Xanthomonas campestris*. Ввиду своих свойств он широко используется в различных сферах промышленности: пищевой, фармацевтической, косметической. Большой объем ксантана применяется при добыче нефти, повышая вязкость растворов и не давая скважине разрушиться. По окончании работ остро встает вопрос удаления ксантановой камеди. В отличие от известных способов химической деградации более экологичными и менее энергозатратными считаются биологические методы. В лабораторных условиях нами был выделен консорциум микроорганизмов, способный разжижать ксантан. Бактериальная симбиотическая культура стала основой для создания стабильного регенерируемого цельноклеточного биокатализатора, способного осуществлять полное биоразложение ксантана. Для иммобилизации были выбраны носители: цеолит, альгинатные микрокапсулы и криогель поливинилового спирта. Цеолитные гранулы могут служить матриком для иммобилизации микроорганизмов из-за его шероховатости, большой удельной поверхности и высокой пористости, хороших механических свойств, низкой себестоимости и незначительных энергозатрат при производстве. При инкапсулировании клеток микроорганизмов на альгинатных микрокапсулах условия включения в гель альгината кальция очень мягкие, полимер можно стерилизовать автоклавированием, процесс иммобилизации обратим. Носители на основе поливинилового спирта (ПВС) обладают высокой реакционной способностью и большой вместимостью по отношению к клеткам. Из трех исследованных типов носителей для иммобилизации целых клеток стабильнее и долговечнее показали себя носители на основе поливинилового спирта. Биокатализатор на основе ПВС был испытан в течение 40 циклов разжижения ксантана от исходной вязкости 230 сП до 1,2 сП без потери формы и общей ксантанолитической активности. Использование иммобилизованных биокатализаторов в виде клетко-продуцентов ксантан-модифицирующих ферментов дает возможность многократно и длительно использовать эти биокатализаторы для получения конечного продукта.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075-15-2019-1663.

КАПСУЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ *ACINETOBACTER BAUMANNII*: СТРОЕНИЕ И РАСЩЕПЛЕНИЕ ДЕПОЛИМЕРАЗАМИ БАКТЕРИОФАГОВ

А.А. Касимова¹, Н.П. Арбатский¹, А.М. Шпирт¹, С.Н. Сенченкова¹, Ю.А. Книрель¹, М.М. Шнайдер², А.В. Попова²

¹Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина

и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Acinetobacter baumannii – граммотрицательная условно-патогенная бактерия широко распространенная в природе и внутрибольничной среде. Является основной причиной внутрибольничных инфекций таких как менингит, пневмония, инфекции мочеполовых путей, сепсис и другие. Их лечение осложняется способностью бактерий приобретать и накапливать различные механизмы антибиотикоустойчивости, что делает актуальным поиск альтернативных способов борьбы с инфекциями. Например, фаготерапия, основанная на лизисе бактериальных клеток вирусами бактерий – бактериофагами, и вакциноterapia с использованием конъюгатных иммунопрепаратов. Клетки *A. baumannii* окружены защитной капсулой, состоящей из капсульного полисахарида (КПС). Широкое структурное разнообразие КПС *A. baumannii* обусловлено вариабельностью генового состава хромосомного локуса, кодирующего ферменты, участвующие в биосинтезе КПС. В настоящей работе изучено строение новых КПС штаммов *A. baumannii*. КПС выделяли методом водно-фенольной экстракции из сухих бактериальных клеток и очищали с помощью гель-проникающей хроматографии. Моносахаридный состав КПС определяли анализом ацетатов полиолов методом газожидкостной хроматографии. Строение КПС устанавливали с помощью ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопии с использованием двумерных экспериментов ¹H,¹H COSY, ¹H,¹H TOCSY, ¹H,¹H ROESY, ¹H,¹³C HSQC и ¹H,¹³C HMBSC, а также с использованием методов химической модификации. С целью создания биохимической основы для фаготерапии ацинетобактерных инфекций выяснены механизмы расщепления КПС *A. baumannii* рекомбинантными деполимеразами специфических бактериофагов и профаговыми деполимеразами. Олигосахаридные продукты расщепления фракционировали с помощью гель-проникающей хроматографии и исследовали методами масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением и ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопией. Было установлено, что все деполимеразы обладали гликозидазной активностью и специфически расщепляли одну из гликозидных связей в повторяющихся звеньях КПС

по гидролитическому механизму, давая мономеры и/или олигомеры повторяющихся звеньев КПС. Полученные олигосахариды будут использованы для получения конъюгатных вакцин против ацинетобактерных инфекций. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-14-00273.

УГЛЕВОДСОДЕРЖАЩИЕ БИОПОЛИМЕРЫ МОРСКИХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

М.С. Косоулин, А.С. Кузьмич, Л.А. Романенко, О.В. Черников

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Одним из основных интересов к изучению морских грамотрицательных бактерий является их способность продуцировать биологически активные соединения, имеющие фармакологический и биотехнологический потенциал. Особое место среди них занимают углеводсодержащие биополимеры, которые часто проявляют низкую токсичность, а их структурные особенности могут быть использованы при разработке новых лекарственных препаратов. За последние несколько лет нами были выделены, установлены структуры и изучены биологические свойства липополисахаридов (ЛПС) и капсульных полисахаридов (КПС) отдельных представителей морских грамотрицательных бактерий. Микроорганизмы *Cobetia pacifica* КММ 3879Т и КММ 3878, *S. litoralis* КММ 3880Т, *Idiomarina abyssalis* КММ 227Т, *Kangiella japonica* КММ 3897, *Halomonas halocynthiae* КММ 1376Т, *Poseidonocella sedimentorum* КММ 9023Т и *P. pacifica* КММ 9010Т продуцируют уникальные сульфатированные КПС, не характерные для большинства грамотрицательных бактерий и проявляющие антипролиферативные свойства в отношении опухолевых клеток. Изучен механизм антипролиферативного действия КПС из микроорганизма *K. japonica* по отношению к клеткам протоковой карциномы молочной железы линии Т-47Д. Показано, что полисахарид индуцирует арест клеточного цикла в фазе G0/G1, ингибируя образование активных комплексов CDK4/CDK6/D1 и фосфорилирование белка Rb. Кроме того, КПС усиливает экспрессию проапоптотического белка Вах и подавляет экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2. Увеличение экспрессии Bcl-2 индуцирует снижение мембранного потенциала митохондрий, высвобождение цитохрома С, расщепление PARP, что в конечном итоге приводит к апоптозу. Установлены структуры липидных фрагментов молекул ЛПС из микроорганизмов *S. pacifica* КММ 3879Т, *Echinicola pacifica* КММ 6172Т, *E. vietnamensis* КММ 6221Т, *K. japonica* и *I. zobellii* КММ 231Т. Отличительной особенностью молекул липида А морских бактерий является их низкая степень ацилирования, а также содержание жирных кислот, не характерных для ЛПС энтеробактерий. Показано, что все исследованные ЛПС являются слабыми индукторами синтеза провоспалительных цитокинов и проявляют антагонистические свойства по отношению к ЛПС *Escherichia coli*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и МНТ (№ 21-51-52005) и грантом РФФИ № 22-24-00919;

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ФУКОИДАНОВ ИЗ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ БАРЕНЦЕВА МОРЯ

И.М. Лапина^{1,2}, Е.Д. Облучинская³, Е.В. Журишкина^{1,2}, А.А. Кульминская^{1,2}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

²Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина; ³Мурманский морской биологический институт РАН, Мурманск

При лечении онкологических заболеваний важной задачей является снижение агрессивного воздействия химиопрепаратов на здоровые клетки при сохранении эффективности терапии. Востребованностью альтернативных методов непосредственной или вспомогательной терапии злокачественных опухолей обусловлен поиск соединений природного происхождения, повышающих устойчивость организма к развитию опухолей и снижающих возможность рецидива после лечения. Морские водоросли являются источниками ценных соединений, многие из которых не встречаются у наземных организмов. Фукоиданы, сульфатированные полисахариды из клеточных стенок бурых водорослей, обладают широким спектром биологических активностей, среди которых противоопухолевая и антиоксидантная активности вызывают особый интерес. Избирательность биологического действия связана со структурными характеристиками фукоиданов. Существует необходимость исследования взаимосвязи химического состава, структуры, молекулярной массы, степени сульфатирования и биоактивности. Указанные характеристики фукоиданов зависят от места обитания, сезона сбора и репродуктивной фазы водорослей.

Целью работы являлось изучение противоопухолевых и антиоксидантных свойств фукоиданов, выделенных из талломов бурых водорослей *Fucus vesiculosus*, *Fucus distichus*, *Fucus serratus* и *Ascophyllum nodosum*, собранных в губе Зеленецкой Баренцева моря.

Фукоиданы были получены по оригинальной технологии ММБИ РАН. В работе были использованы клетки карциномы человека HeLa G63. Антиоксидантная активность фукоиданов была определена методом DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил). Химический состав фукоиданов был определен спектрофотометрическим и ВЭЖХ методами. Молекулярная масса определена эксклюзионной хроматографией, структура – методом ИК-спектроскопии.

По данным проточной цитометрии, обработка клеток HeLa G63 исследуемыми фукоиданами в течение 48 часов приводила к увеличению числа погибших клеток, причем влияние фукополисахаридов, выделенных из *F. vesiculosus*, на гибель клеток выражено сильнее по сравнению с остальными фукоиданами. Антиоксидантная активность фукоидана из *F. vesiculosus* также превышала активность других образцов более, чем в 2 раза. Установление взаимосвязи химического состава и структуры фукоиданов с биологической активностью анализируется в представленной работе.

НЕ ВСЕ АНТИГЛИКАНОВЫЕ АНТИТЕЛА СПОСОБНЫ СВЯЗЫВАТЬ КОМПЛЕМЕНТ

А.Д. Липатников¹, С.В. Хайдуков¹, Н.В. Бовин¹, Н.Р. Хасбиуллина², Н.В. Шилова^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова; ²НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова МЗ РФ, Москва

Естественные антитела к гликанам (АГАТ) являются значимой частью пула естественных антител организма, функции которых в настоящее время активно изучаются. Предполагается, что по аналогии с более изученными естественными антителами к белкам и ДНК, АГАТ могут выполнять надзорную функцию, участвуя в элиминации патологически измененных клеток. Кровь человека содержит сотни АГАТ, однако лишь некоторые из них элиминируют клетки, привлекая систему комплемента. С помощью гликочипа, содержащего несколько сотен различных гликанов, а также О-полисахаридов различных бактерий, была изучена способность АГАТ классов G и M здоровых доноров связываться с опсонизирующим компонентом комплемента C3b. Оказалось, что почти все из обнаруженных с помощью чипа АГАТ способны связывать C3d, т.е. участвовать в каскаде комплемента. К ним относятся как IgG, так и IgM, направленные к О-полисахаридам бактерий, а также коротким фрагментам бактериальных ПС: ManNAc β , Rha α , GlcNAc β и др.; гликанам типа X-GalNAc α , антигену Форсмана, дисахариду Gal β 1-3GlcNAc β (LeC); а также антигенам группы крови системы ABO и др. Кроме того, были обнаружены антитела, не способные привлекать C3b, но связавшиеся на гликочипе с рядом О-полисахаридов, а в случае IgG – с аминокислотными производными лактозы вида Gal β 1 \rightarrow 4Glc β –NHCOCH₂NH–аминокислота. Для выборочного контроля полученных результатов, были взяты антитела к дисахариду LeC и «антилактозные» к Gal β 1 \rightarrow 4Glc β –NHCOCH₂NH–Leu. Исследование проводили с использованием гемолитического теста на кодецитах (эритроцитах, чья поверхность модифицирована соответствующим антигеном), используя аффинно выделенные из пула иммуноглобулинов человека антитела и гомологичную сыворотку крови как источник комплемента. Взаимодействие антител с кодецитами подтверждали цитофлуориметрией. Оказалось, анти-LeC-антитела, способные связывать C3d по результатам гликочипа, взаимодействуют с соответствующими кодецитами, вызывая их лизис после добавления источника комплемента, однако антилактозные (см. выше) антитела, несмотря на взаимодействие с кодецитами на уровне 30%, оказались не способны активировать систему комплемента. Понимание механизма этого явления требует дополнительных исследований. Работа выполнена при частичной поддержке гранта РНФ № 22-24-00398.

КЛЕТОЧНЫЕ СТЕНКИ *ENTEROCOCCUS FECALIS* АКТИВИРУЮТ ТОЛЕРОГЕННОСТЬ ИММУННЫХ КЛЕТОК У МЫШЕЙ MUC2-/- IN VIVO И IN VITRO

Е.А. Литвинова^{1,2}, Е.А. Блинова^{1,3}, Н.А. Феофанова^{1,3}, М.Ш. Барковская^{1,3}, Г.В. Калмыкова^{1,2}, Н.И. Акулова^{1,2}, Е.Л. Аржанова¹, В.Д. Бец²

¹НИИ нейронаук и медицины; ²Новосибирский государственный технический университет, Физико-технический факультет; ³НИИ клинической и фундаментальной иммунологии, Новосибирск

Иммунные клетки способны распознавать поверхностные гликаны бактерий. В зависимости от степени фукозилирования гликанов клеточных стенок бактерий может развиваться воспалительный ответ при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК). *Enterococcus spp.* имеют гены фукозилтрансферазы, и могут встраивать фукозу в поверхностные гликаны. Рецептор DC-SIGN на поверхности иммунных клеток способен распознавать фукозу в составе гликанов, в результате чего происходит активация макрофагов и дендритных клеток. В свою очередь дендритные клетки могут активировать Т-клетки и запускать различные типы иммунного ответа. У мышей Muc2^{-/-}, которые являются моделью ВЗК, в ткани толстой кишки развивается хроническое воспаление. Переключение воспалительной реакции на толерогенный ответ может облегчить состояние при ВЗК. Цель данного исследования - определить будут ли гликаны бактериальных стенок *Enterococcus faecalis*, выделенных из кишечника мышей C57BL/6, запускать процессы в дендритных клетках мышей Muc2^{-/-}, которые активируют Т-клетки по толерогенному пути *in vitro* и *in vivo*.

Дендритные клетках (ДК) сгенерированы из костного мозга Muc2^{-/-} и мышей C57BL/6. Проточной цитометрией определяли фенотип ДК до и после обработкой культивирования с бактериями, в клеточных стенках которых была фукоза, с использованием антител I-Ab, CD80, CD86, CD209, CD11c (BioLegend). На поверхности бактерий определяли фукозилированные гликаны с помощью UEA I меченного FITC. В модели *in vivo* мышам Muc2^{-/- per os} вводили суспензию *E. faecalis* в течение 3-х недель. У мышей определяли фенотип лимфоцитов региональных лимфоузлов и тип активации макрофагов.

Гликаны на поверхности бактерий влияли на представленность DC-SIGN и поверхностных маркеров ДК в экспериментах *in vitro*. DC-SIGN может влиять на активность ДК через TLR рецепторы. Активированные ДК при ко-культивировании с наивными Т-клетками будут запускать их дифференцировку в про- или противовоспалительный тип. Подселение *E. faecalis* мышам Muc2^{-/-} снижало экспрессию внутриклеточного CD38 в макрофагах, который запускает воспалительный процесс. Данная работа была поддержана грантом РНФ # 20-64-47020.

БИОГРАФИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ УТОЛЩЕННЫХ НЕЛИГНИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТенок РАСТЕНИЙ

П.В. Микшина, О.В. Сауткина, А.Д. Панина, Н.Е. Мокшина, Т.А. Горшкова

КИББ – Обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН, Казань

Клеточная стенка – неотъемлемая многофункциональная структура любой растительной клетки, построенная, главным образом, на основе разнообразных по структуре и свойствам полисахаридов. В зависимости от специализации и функции клетки способны формировать различные типы клеточных стенок, отличающиеся как по толщине, так и по составу и архитектуре. Ключевым механическим тканям растений – колленхиме и склеренхиме, присущи утолщенные нелигнифицированные клеточные стенки различных типов. Для клеток колленхимы, обеспечивающей механическую функцию в молодых растущих органах растений, характерна утолщенная первичная клеточная стенка, ключевыми компонентами которой служат

целлюлоза, пектины и ксиланоглюкан. Для склеренхимы, представленной волокнами, присуща третичная клеточная стенка, состоящая, главным образом, из целлюлозы и минорного компонента пектиновой природы – рамногалактуронана I, несущего боковые галактановые цепи.

В докладе на примере клеточных стенок клеток колленхимы черешков листа сельдерея и волокон стебля льна будет детально представлена организация утолщенных нелигнифицированных первичных и третичных клеточных стенок, диктуемая составом и особенностями взаимодействий ключевых типов полисахаридов, охарактеризована специфика строения и свойств этих биополимеров, обеспечивающая их функциональную пригодность, и описаны некоторые аспекты их биосинтеза и модификаций *in vivo*. Работа поддержана грантом РНФ № 20-14-00335.

ТИПЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК: ОТ ГЕНОВ ДО ПОЛИСАХАРИДОВ

Н.Е. Мокшина

КИББ – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань

В настоящее время современная биология растений переживает настоящий бум молекулярно-генетических исследований. При этом клеточная стенка растений, компартмент, основу которого представляют полисахариды, и который во многом определяет биологию растительного организма, по-прежнему остается довольно сложным объектом для молекулярно-генетических изысканий. Так, до сих пор до конца не расшифрован механизм биосинтеза целлюлозы, самого распространенного органического соединения на нашей планете. На примере функционирования целлюлозосинтазного комплекса в докладе будут рассмотрены современные представления о биосинтезе целлюлозы разных типов клеточных стенок. Кроме того, будут обсуждены вопросы современной номенклатуры, описывающей типы клеточных стенок, ее актуальность в современной биологии и необходимость пересмотра, поскольку с помощью методов геномной инженерии учеными создаются структуры, которые не вписываются в существующие «классические» концепции типов клеточных стенок. Отдельное внимание будет уделено методам молекулярной биологии, которые используются в работах, направленных на изучение регуляции формирования клеточных стенок и их функционирование. Бурное развитие геномных и постгеномных технологий, связанное с разработкой и накоплением big data, стало триггером для разработки дополнительных алгоритмов для их систематизации и более глубокого анализа. Примером реализации таких алгоритмов служит база экспрессионных данных льна и тополя «FI-VexDB», которая оказалась эффективным инструментом для визуализации данных и поиска закономерностей в экспрессии генов, о принципах построения и преимуществах которой также пойдет речь в докладе.

При частичной финансовой поддержке РНФ №20-44-07005.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ ПОРТРЕТ АРАБИНОФУРАНОЗИДАЗ КУКУРУЗЫ: ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ГОМОЛОГИЧНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

А.Р. Назипова, О.Н. Макшакова, Л.В. Козлова

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань

α -L-арабинофуранозидазы (ЕС 3.2.1.55) удаляют терминальную арабинозу из арабинозосодержащих полисахаридов в клеточных стенках растений. Модификация таких полисахаридов лежит в основе различных физиологических процессов, например, созревание и размягчение плодов, рост растяжением. Арабинофуранозидазы растений относятся к 51 семейству гликозилгидролаз (GH) и кодируются значительным числом генов в геномах злаков. В нашей работе мы идентифицировали четыре гена кукурузы, кодирующие полноразмерные α -L-арабинофуранозидазы, построили их 3D-модели, используя структуру гомологичного грибного белка в качестве шаблона, и провели молекулярный докинг полученных моделей с различными олигосахаридами для оценки субстратных предпочтений. Разнообразие арабинофуранозидаз в растениях оценили методами филогенетического и структурного анализа *in silico*. Было выявлено, что появление α -L-арабинофуранозидаз GH51 у растений совпадает с появлением арабинозы в их клеточных стенках, а СВМ4-подобный домен на N-конце уникален для белков семейства GH51 и обнаружен в 90% растительных последовательностей. СВМ4-подобный домен похож на бактериальный СВМ4, но из-за замены ключевых аминокислотных остатков он, по-видимому, не способен связывать углеводы. Несмотря на большое количество изоферментов GH51 в злаках (*Poa*les), почти половина белков GH51 у *Poa*les имеет мутацию каталитической аминокислоты, играющей роль акцептора в ферментативной реакции, что делает их потенциально неактивными. Данные о транскрипции и трансляции генов изоформ GH51 в кукурузе из открытых источников были проанализированы для обсуждения возможных функций отдельных изоферментов. Результаты гомологического моделирования и молекулярного докинга показали, что размер и форма сайта связывания субстрата точно соответствует терминальной арабинофуранозе и что арабиноксилан является более предпочтительным субстратом для всех ферментов GH51 кукурузы, чем арабинозан или арабиногалактан арабиногалактановых белков. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, № проекта 18-14-00168.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИЦИНА С РАСТИТЕЛЬНЫМИ ПОЛИСАХАРИДАМИ

А.В. Никифорова¹, В.В. Головченко², П.В. Микшина³, О.А. Патова², Т.А. Горшкова³, А.Ю. Нокель^{1,4}, Н.В. Бовин¹, Н.В. Шилова^{1,4}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар; ³ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань; ⁴НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва

Рицин (RCA), известный как β -галактозосвязывающий лектин, активно используется как инструмент в гликобиологии для характеристики гликозилирования, в первую очередь в тканях млекопитающих. Тем не менее появились доказательства того, что его реальная специфичность, связанная непосредственно с ролью рицина в растениях, является слабо изученной,

что обусловлено в первую очередь отсутствием подходящих методов. Применение технологии гликоэкреев является эффективным инструментом для определения неизвестной ранее специфичности ризицина. В настоящем исследовании использовались полисахаридный эррей, содержащий 113 растительных полисахаридов (ПС), выделенных из различных растений, и более 20 моно- и олигосахаридов – основных компонентов изучаемых ПС, а также компонентов N-цепей гликопротеинов. Оказалось, что ризицин способен взаимодействовать с 23 из 113 ПС, в том числе с ксиланом и галактоманнаном, в составе которых преобладают глюкоза и манноза, соответственно (>60%). Во всех связавшихся с данным лектином лигандах были также идентифицированы и остатки галактозы (от 3 до 94 вес%), которые, предположительно, могут входить в боковые цепи растительных ПС. Для того, чтобы выяснить, взаимодействует ли ризицин с Gal в боковых цепях, мы обработали чип β -галактозидазой из *Aspergillus niger*, способной отщеплять терминальные остатки галактозы. При сравнении профиля специфичности ризицина на чипе с обработкой ферментом и без нее, значительных изменений не наблюдали, что свидетельствует о том, что ризицин способен связываться с более сложными эпитопами, возможно, с пространственными.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-63-47110.

О КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ФУНКЦИЯХ, ПОЛУЧЕННЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА РАСТВОРАМИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

А.В. Орлова¹, Т.В. Лаптинская², Л.О. Кононов³

¹Ресурсный центр «Медицинский Сеченовский Предвуниверсарий»; ²Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова;

³Институт органической химии им Н.Д. Зелинского РАН, Москва

Недавно стали появляться работы [1–6], посвященные динамическому рассеянию света (ДРС) растворами низкомолекулярных веществ, с описанием и обсуждением наноразмерных светорассеивающих частиц.

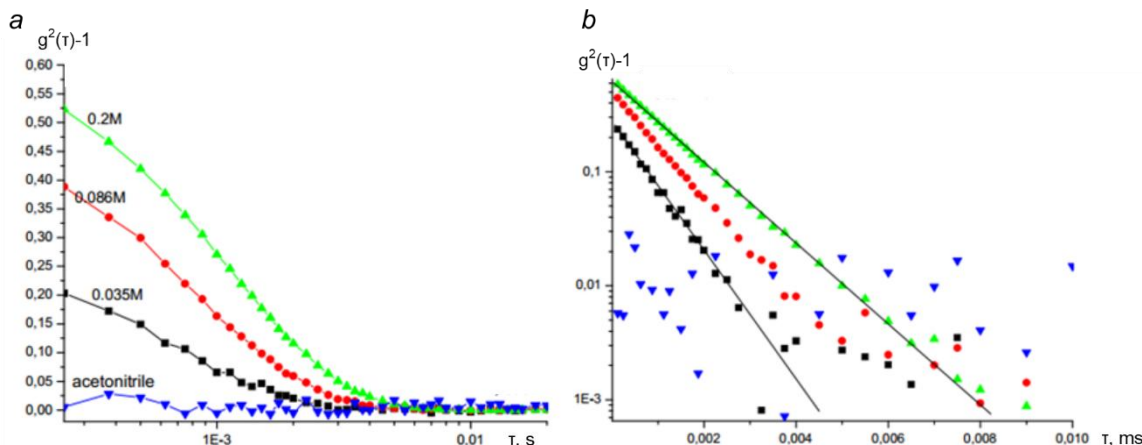


Рис. 1. Данные динамического рассеяния света (ДРС), корреляционные функции для растворов метил(фенил-5-трифторацетоамид-4,7,8,9-тетра-*O*-ацетил-3,5-дидезокси-2-тио-*D*-глицеро- β -*D*-галактононулопиранозид)оната в безводном ацетонитриле с концентрациями: черные квадраты – 0.035 моль/л, красные круги – 0.086 моль/л, зеленые треугольники – 0.2 моль/л, синие обратные треугольники – чистый ацетонитрил.

На примере растворов метил(фенил-5-трифторацетоамид-4,7,8,9-тетра-*O*-ацетил-3,5-дидезокси-2-тио-*D*-глицеро- β -*D*-галактононулопиранозид)оната в безводном ацетонитриле нами показана возможность применения ДРС для растворов низкомолекулярных веществ с унимодальной корреляционной функцией.

Литература

1. Sedláč M. // J. Phys. Chem. B 2006, V. 110, P. 13976.
2. Kononov L. O., Malysheva N. N., Orlova A. V. et al. // Eur. J. Org. Chem. 2012, P. 1926.
3. Orlova A. V., Andrade R. R., da Silva C. O. et al. // ChemPhysChem 2014, V. 15, P. 195.
4. Orlova A. V., Laptinskaya T. V., Malysheva N. N., Kononov L. O. // J. Solut. Chem. 2020, V. 49, P. 629.
5. Troncoso J., Zemánková K., Jover A. // J. Mol. Liq. 2017, V. 241, P. 525-529.
6. Орлова А.В., Ахиадорме Д.А., Лаптинская Т.В., Кононов Л.О. // Изв. АН. Сер. Хим. 2021, № 11, С. 2214.

КОВАЛЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ГЛИКОКАЛИКСА КЛЕТКИ

И.М. Рыжов, М.С. Савченко, Е.В. Сливка, Е.М. Рапопорт, А.Б. Тузиков, Н.В. Бовин

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

Гликокаликс – это надклеточный слой, представляющий собой организованный комплекс мембранно-связанных и несвязанных молекул, в первую очередь, гликопротеинов, протеогликанов и гликолипидов. Толщина гликокаликса животных клеток обычно варьирует от 30 до 500 нм, минимальна она у эритроцитов (5–15 нм), а у эндотелиальных клеток может достигать 4.5 мкм. До сих пор неизвестны механизмы транспорта биомолекул и внеклеточных везикул из одной клетки в другую через два слоя гликокаликса – клетки-донора и клетки-акцептора. Согласно исследованиям, полученным с помощью электронной микроскопии, гликокаликс представляет собой квазиупорядоченную 3D-структуру, с расстояниями между кла-

стерами гликанов до 100 нм. Если белкам не составит труда проникнуть через такую «сетку», то для микровезикул, размер которых выше 100 нм, такое проникновение представляется как минимум затруднительным. Для изучения механизма естественного транспорта микровезикул через гликокаликс в первую очередь необходимо знать макроструктуру гликокаликса, то есть, как устроена в нем система пор/каналов, насколько они велики и гетерогенны. Для этого мы предлагаем метод ковалентного маркирования, то есть, тотальное флуоресцентное мечение всех «твердых» компонентов (не пустот), с последующей конфокальной микроскопией. Это можно сделать по аминокетильным группам гликопротеинов и протеогликанов с помощью флуоресцентных молекул, имеющих в составе активированную карбоксильную группу. Предполагалось, что такие реагенты малого размера будут проникать легко и метить гликокаликс неселективно, в то время как реагенты везикулярного размера – проникать и метить только соответствующие крупные поры и полости. Изучение процесса в динамике открывает возможность оценить скорость и траектории прохождения гликокаликса объектами принципиально разного размера. В нашем сообщении будут доложены первые результаты применения метода ковалентного маркирования.

Работа поддержана грантами РФФИ № 22-23-00756 и № 22-24-00672.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ХИТИНАЗ ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА *PARALITHODES CAMTSCHATICUS*

К.С. Рысакова, В.Ю. Новиков

Полярный филиал "ВНИРО" ("ПИРО" им. Н.М. Книповича), Мурманск

Камчатский краб *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815) является одним из важнейших промысловых видов ракообразных на Кольском полуострове. Кроме деликатесного мяса из камчатского краба можно получать ценные биологически активные вещества различного назначения: биополимеры хитин и хитозан, каротиноиды, непредельные жирные кислоты, гемоглобин. В нашей работе было проведено детальное изучение фракционирования белков гепатопанкреаса краба на нескольких ультрафильтрационных мембранах и проанализировано распределение активности хитинолитических ферментов по фракциям с разной молекулярной массой (ММ) и сравнение с распределением ферментов другой субстратной специфичности. Исходный ферментный препарат (ФП) был получен путем экстракции воды и липидов последовательно ацетоном и бутанолом при низкой температуре. Фракционирование проводили методом ультрафильтрации на полуволоконных мембранах с молекулярно-массовыми пределами задержания: 5, 10, 20, 50, 100 и 300 кДа. Лиофилизированные фракции были исследованы на наличие гликолитической (хитинолитической), протеолитической и липолитической активности. Проведенные исследования показали, что ультрафильтрация на мембранах с разными молекулярно-массовыми пределами задержания позволяет выделить из комплекса ферментов гепатопанкреаса камчатского краба фракции, проявляющие разную активность в отношении гидролиза хитина и белков. Экзохитинолитические ферменты были сосредоточены в двух фракциях 20-50 и 100-300 кДа, эндохитинолитическая активность была обнаружена в диапазоне молекулярных масс 50-100 кДа. Максимальная хитинолитическая активность наблюдалась во фракции 100-300 кДа и была в 16 раз выше, чем в исходном ферментном препарате. Для сравнения была определена протеолитическая и липазная активность во всех фракциях. В ходе эксперимента выяснилось, что протеазы ферментного комплекса сконцентрированы в диапазоне 20-50 кДа, в то время как липазы обнаружены во фракциях 10-20, 20-50 и 100-300 кДа. Полученное обогащение каждой фракции белками с разными ММ позволило заметить преобладание исследуемых видов активности в разных фракциях, что может служить свидетельством того, что за протеолитическую, хитиназную и липазную активность ответственны ферменты с разными ММ.

РОЛЬ МИКРОБНЫХ ГЛИКАНОВ В РАСТИТЕЛЬНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ

Ю.П. Федоненко^{1,2}, Е.Н. Сигида¹, С.А. Коннова^{1,2}

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН; ²Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

В естественных экосистемах растения сосуществуют с самыми разнообразными микроорганизмами, и в силу иммобилизованного существования вынуждены адаптироваться к динамичной среде, воспринимая и интегрируя большие объемы информации. Взаимодействие бактерий с растениями осуществляется через реализацию трех различных стратегий (патогенез, мутуализм, ассоциация), в каждой из которых задействован характерный набор сигнальных молекул. В молекулярном диалоге между растениями и бактериями ключевую роль играют микробные гликополимеры – наиболее структурно сложная и разнообразная группа биомолекул. Продуцируемые бактериями гликаны и гликоконъюгаты действуют как микробные мессенджеры, основной задачей которых является подготовка колонизации растения-хозяина. С другой стороны, гликаны поверхности микробных клеток являются важными индикаторами микробного присутствия (microbial- or pathogen-associated molecular patterns (MAMPs or PAMPs)). Они представляют собой консервативные структуры, обычно открытые и, таким образом, доступные для гидролитических ферментов растений. В докладе будут рассмотрены биологические функции нативных гликополимеров грамотрицательных бактерий (экстраклеточных и капсульных полисахаридов, липополисахаридов), а также продуктов их ферментативного распада (олигосахаридов) в коммуникативных процессах с растениями, в том числе взаимодействии со специфичными рецепторами, передаче сигнала, активации каскада ответных реакций, позволяющих растению изменить собственный физиологический статус, чтобы обеспечить защиту от патогена либо запустить симбиотическую (мутуалистическую) программу. При этом действие как патогенных, так и симбиотических микроорганизмов направлено на подавление иммунного статуса растений, поскольку это главное условие успешной колонизации растения-хозяина.

СОПОСТАВЛЕНИЕ ПРЕБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ТИПОВ

М.В. Харина, А.А. Михайлова, П.В. Микшина

КИББ – Обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань

Микробные сообщества, населяющие кишечник человека, определяют иммунитет и устойчивость к патогенным факторам и влияют на его здоровье. Исследования особенностей пребиотических свойств для различных видов углеводов демонстрируют, что есть различия в степени их проявления и специфика в «пищевой пригодности» для различных групп микроорганизмов, населяющих толстый кишечник человека. В этой связи становится крайне актуальным изучение взаимосвязи между структурными типами используемых в качестве пребиотических препаратов природных углеводов и проявляемыми ими эффектами в отношении микробиоты человека, на что и направлена эта работа.

В качестве различных структурных типов полисахаридов в работе были проанализированы арабиногалактан из гумиарабика, ксилан бука, яблочный пектин (гомогалактуронан), а также арабиноксилан и рамногалактуронан I слизи семян льна. Все образцы были охарактеризованы по составу, молекулярно-массовому распределению и степени чистоты. Оценка пребиотической активности полисахаридов проводили в системах *in vitro* в анаэробных условиях в отношении *Bifidobacterium bifidum* 791 и *Lactobacillus acidophilus* n.v. Ep 317/402.

Установлено, что внесение в питательные среды различных типов полисахаридов (3 мг/мл) приводило к интенсификации продукции молочной кислоты и увеличению выхода биомассы бифидо- и лактобактерий. Для *Bifidobacterium bifidum* 791 прирост биомассы (КОЕ/мл) при внесении в среду культивирования ксилана бука возрастал на 3,5% по сравнению с контролем, при добавлении полисахаридов слизи семян льна – на 12,3%, яблочного пектина – на 110,5%, арабиногалактана акации – на 215,8%. При культивировании *Lactobacillus acidophilus* n.v. Ep 317/402 с добавлением яблочного пектина выход биомассы увеличивался на 1,5% по сравнению с контролем, с ксиланом бука – на 7,7%, с полисахаридами слизи семян льна – на 69,2% и с арабиногалактаном акации – на 207,7%.

Сопоставление биологических свойств растительных полисахаридов различных структурных типов будет служить базой платформой для разработки пребиотических препаратов на их основе.

МИТИЛЕКТИНЫ - СЕМЕЙСТВО GAL-СВЯЗЫВАЮЩИХ ЛЕКТИНОВ ИЗ МИДИЙ

О.В. Черников, И.В. Чикалов, В.И. Молчанова, А.П. Фильштейн, А.С. Кузьмич, Т.О. Мизгина

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Лиганд-рецепторное распознавание занимает центральное место в биологических системах, а углевод-белковое взаимодействие рассматривается как один из наиболее важных механизмов передачи биологической информации на уровне клетки. Благодаря высокой избирательности связывания с углеводными участками клеточной мембраны, лектины принимают участие в самых тонких процессах на клеточном, субклеточном и органном уровнях в живых организмах, таких как оплодотворение, эмбриогенез, миграция клеток, регенерация тканей, иммунитет и т.д. На сегодняшний день присутствие лектинов обнаружено в различных тканях большого количества видов морских беспозвоночных. В отличие от веществ наземного происхождения, характерной особенностью лектинов морских беспозвоночных является реализация необычных и самых «древних» путей биосинтеза. Это связано с тем, что их организмы-продуценты (губки, асцидии, двусторчатые моллюски и другие беспозвоночные) являются одними из первых живых многоклеточных существ на нашей планете, в которых и берет начало «химическая эволюция» природных соединений. Двусторчатые моллюски (мидии, гребешки, устрицы) представляют особый интерес для исследователей, поскольку являются массовыми объектами марикультуры во многих странах мира. Такой повышенный интерес к ним обусловлен наличием ценных пищевых и лечебных качеств. GalNAc/Gal-специфические лектины, названные CGL и MTL, были выделены и охарактеризованы из съедобных видов мидий *Crenomytilus grayanus* и *Mytilus trossulus*. Анализ аминокислотной последовательности этих белков показал, что они вместе с другим лектином мидий образуют новое семейство лектинов «Митилектины». Характерной структурной особенностью данного семейства лектинов является тип укладки β-трилистник. Обладая схожей структурой и углеводной специфичностью, представители данного семейства лектинов проявляют различную биологическую активность. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства по науке и технологиям Тайваня в рамках научного проекта № 21-54-52005.*

ПОЛИСАХАРИДЫ ТРЕТИЧНОЙ КЛЕТочНОЙ СТЕНКИ У ВОЛОКОН РАСТЕНИЙ ИЗ РАЗНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП

Т.Е. Чернова, М.В. Агеева, Н.Н. Ибрагимова, О.И. Трофимова, П.В. Микшина, Т.А. Горшкова

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань

После выхода растений из водной среды обитания на сушу, у них возникла необходимость в развитии механической ткани. Помимо некоторых других типов клеток и тканей механическую функцию взяли на себя волокна с третичной клеточной стенкой. В настоящее время такой тип клеточной стенки описан только для волокон. Для третичной клеточной стенки характерно высокое содержание целлюлозы, продольная ориентация её микрофибрилл и присутствие рамногалактуронана I в качестве основного матриксного полисахарида. Именно участие этого пектинового компонента в сборке третичной клеточной стенки имеет ключевое значение в способности волокон приобретать контракильные свойства и функционировать в качестве растительных «мускулов», способных удерживать тяжелые плоды или возвращать изогнутому побегу вертикальное положение.

В ходе проведенных исследований установлено, что третичная клеточная стенка довольно рано появляется в ходе эволюции растений. Это подтверждается ее обнаружением у примитивных в эволюционном отношении представителей высших растений – современных хвощей. Третичные клеточные стенки представителей всех проанализированных таксонов объеди-

няют общие характеристики: отсутствие лигнификации, высокое содержание целлюлозы, присутствие эпитопов к антителам, специфичным к остову или боковым цепям рамногалактуронана I, наличие во фракциях буферозэкстрагируемой и полисахаридов, прочноудерживаемых микрофибриллами целлюлозы, высокомолекулярного рамногалактуронана I с боковыми β -1,4-галактановыми и α -1,5-арабинановыми цепями. Однако обнаружены некоторые вариации в организации боковых цепей рамногалактуронана I у представителей разных таксономических групп, что вероятно указывает на изменения этого типа клеточной стенки в ходе эволюции наземных растений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00361).

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ *ACINETOBACTER BAUMANNII* ПРОТИВ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ЭТИМИ БАКТЕРИЯМИ

А.М. Шпирт¹, Ф.А. Бровко², А.А. Касимова¹, Н.П. Арбатский¹, А.С. Шашков¹, Н.В. Руденко², А.В. Замятина², М.М. Шнейдер², А.В. Попова³, А.П. Каратовская², Ю.А. Книрель¹

¹Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва; ²Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва; ³Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный

Acinetobacter baumannii – патоген с множественной лекарственной устойчивостью, вызывающий внутрибольничные инфекции с высокой летальностью. Клетки *A. baumannii* окружены типоспецифическим капсульным полисахаридом (КПС), который обеспечивает устойчивость к защитным механизмам хозяина и рассматривается как мишень для пассивной иммунизации. КПС построен из структурно разнообразных повторяющихся олигосахаридных единиц (К-звеньев). Методом перйодатного окисления и с использованием мостика, образованного квадратной кислотой, синтезированы конъюгаты олигосахаридных фрагментов КПС с белками, содержащими различное число К-звеньев.

Олигосахаридные фрагменты получены из КПС *A. baumannii* типов (K9, KZ1093, KZ1098, Ab5001, K1) путем расщепления КПС как с помощью специфических бактериофагов, так и химическими способами, и на их основе синтезированы гликоконъюгаты.

Изучена протективная способность модельных гликоконъюгатов на основе КПС *A. baumannii* типа K9. Об их протективной эффективности свидетельствовало отсутствие бактерий в крови и селезенке иммунизированных животных после заражения летальной дозой *A. baumannii* K9. У мышей Balb/C иммунный ответ на гликоконъюгаты развивался по Th2-типу. Среди КПС-реактивных антител типа K9 преобладали антитела класса IgG, суммарное содержание которых в несколько раз превышало содержание IgM. Иммунные сыворотки характеризовались опсонизирующей способностью практически на протяжении всей жизни подопытных мышей. Иммунные сыворотки были перекрестно-реактивными, но наиболее высокая специфичность наблюдалась в отношении гомологичного антигена, то есть КПС типа K9.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ

РОЛЬ НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА В РАЗВИТИИ ПОСТКОВИДНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ

Д.С. Матюшкина¹, В.А. Шокина¹, П.О. Тихонова², В.А. Манувера³, Д.А. Широков³, Д.Д. Харлампиева³,
В.Н. Лазарев³, А.В. Павленко¹, Г.П. Арапиди³, В.М. Говорун¹

¹НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия; ²Huck Institutes of Life Sciences, The Pennsylvania State University, Pennsylvania, США; ³ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва

Последствия развившейся пандемии COVID-19 показали, что важно не только элиминировать возбудителя из организма, но и проанализировать механизмы возникновения постковидных осложнений. В связи с этим, нами был проведен анализ гуморального ответа пациентов с COVID-19 на линейные и конформационные эпитопы вирусных белков с помощью методов ИФА, хемиллюминесцентного иммуноанализа на микрочастицах (СМЧА) и вестр-блоттинга. Мы использовали автономную версию NetMHCpan 4.1 и NetMHCIIpan 4.0 [Reynisson B. et al. Nucleic Acids Research. 2020] для прогнозирования белковых фрагментов, связывающих наиболее распространенные аллели HLA I и II класса всех известных последовательностей соответственно. Наиболее интригующие и интересные результаты были получены для нуклеокапсидного белка SARS-CoV-2. Титр антител к конформационным эпитопам нуклеопротеина был в 2,5 раза выше в группе тяжелых больных и коррелировал с потребностью больного в кислороде. Не менее важно наличие IgG к линейным эпитопам нуклеопротеина, что может свидетельствовать о риске развития аутоиммунного процесса. Мы проанализировали перекрестную реактивность этих антител с собственными белками человека. С помощью конкурентного вестерн-блоттинга мы выявили, что аутоиммунное проявление обусловлено антителами к нуклеокапсидному белку. В соответствии с возможностью презентации HLA биоинформатическим и масс-спектрометрическим подходом были определены основные возможные мишени аутоантител. В результате исследования мы выяснили, что при мониторинге течения заболевания COVID-19 необходимо измерять не только уровень антител к Spike-белку, но особенно к нуклеопротеину (как линейным, так и конформационным эпитопам). Люди с аллелями HLA A01:01; A26:01; B39:01; B15:01 наиболее подвержены развитию аутоиммунных процессов после COVID-19. Работа выполнена при поддержке государственного задания № 122030900051-9 службы Роспотребнадзора.

ЭКСПРЕССИЯ ПРОТЕАЗЫ ВИЧ-1 ВЫЗЫВАЕТ ВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ РЕАКЦИЮ И ПОВЫШАЕТ МИГРАЦИОННУЮ И МЕТАСТАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ НА МОДЕЛИ СИНГЕННЫХ МЫШЕЙ

А. Кондрашова¹, О. Латышев², А. Латанова^{2,3}, О. Елисеева², О. Смирнова³, Д. Костюшев^{4,5}, А. Костюшева⁴,
Т. Городничева⁶, В. Валуев-Эллистон³, Е. Стародубова³, И. Гордейчук^{1,2,7}, А. Иванов³, М. Беликова^{1,2,3,8},
Е. Баюрова^{1,2}

¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова (Институт полиомиелита), Москва; ²НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва; ³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта; ⁴Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Москва; ⁵Научно-технологический университет «Сириус», Сочи; ⁶Институт трансляционной медицины и биотехнологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва; ⁷Институт трансляционной медицины и биотехнологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва; ⁸Российский университет дружбы народов, Москва

Для белков gp120, tat, rev, nef и обратной транскриптазы ВИЧ-1 был показан онкогенный потенциал, связанный с индукцией окислительного стресса. Онкогенный потенциал других белков ВИЧ-1 изучен мало. Цель данной работы – оценить влияние экспрессии протеазы (PR) ВИЧ-1 на клетки *in vitro* и *in vivo*. Ген, кодирующий консенсусную последовательность PR ВИЧ-1 FSU_A (PR_A), и варианты с инактивирующей мутацией PR_Ai (D25N) и мутациями устойчивости к ингибиторам протеазы PR_Ai2mut (D25N, M46I, I54V) и PR_Ai3mut (D25N, M46I, I54V, V82A) были клонированы в pVAX1 и pRRLSIN.PGK. Иммунотоксичность pVAX_PR_Ai, pVAX_PR_Ai2mut и pVAX_PR_Ai3mut в мышах была оценена как описано [10.3390/microorganisms9061219]. Лентивирусной трансдукцией клеток 4T1luc2 были получены субклоны PR20.1 и PR20.2, экспрессирующие PR_Ai3mut. Уровень АФК в клетках был оценен окрашиванием DCFH2-DA, окисление липидов – по уровню накопления малондальдегида (MDA). Экспрессия факторов ЕМТ (ПЦР-РВ) и миграционная активность (анализ заживления раны) были оценены в присутствии/отсутствии N-ацетил цистеина (NAC, 5μM). Мышам BALB/c подкожно имплантировали 104 клеток PR20.1/PR20.2. Рост опухолей оценивали морфометрически и по *in vivo* биоллюминесценции с дня 1 по 18 (BLI; Spectrum CT). Метастазирование оценивали по BLI внутренних органов *ex vivo*. Субклон PR20.1, но не PR20.2, характеризовался повышенным уровнем АФК, MDA, миграционной активностью в сравнении с 4T1luc2. Добавление NAC не влияло на скорость миграции PR20.1, но увеличивало скорость миграции PR20.2. Уровень экспрессии факторов ЕМТ в PR20.1/PR20.2 не отличался от 4T1luc2. В мышах PR20.2 формировали опухоли большего размера, чем 4T1luc2 и давали больше метастазов. Введение мышам плазмид, экспрессирующих варианты протеазы, приводило к спленомегалии, повышению числа WBC и доли гранулоцитов и снижению доли лимфоцитов относительно контролей. PR ВИЧ-1 усиливает миграцию клеток *in vitro*. *In vivo* экспрессия PR вызывает воспалительную реакцию и увеличивает туморигенную и метастатическую активности клеток. Эффект не связан с окислительным стрессом, но зависит от уровня экспрессии и ферментативной активности протеазы. Работа поддержана РФФИ 19_04_01034; 17_04_0583 для А.К., Е.Б.; РФФИ 20-015-00442; 20-515-12010 для Д.К., А.К.; РУДН НИР №211000-2-000 для М.Б.

АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЕ ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ ДЛЯ ТРАНСДУКЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

А.Д. Егоров

Центр трансляционной медицины, Университет Сириус, Сочи

Показано, что функциональная активность бурой жировой ткани обратно коррелирует с кардиометаболическими заболеваниями (Becher et al., 2021). Активация транскрипционной программы бурого адипогенеза в белой жировой ткани приводит к формированию фенотипа бежевых адипоцитов, в которых происходит интенсивный липолиз и термогенез (Seale et al., 2011). Основные исследования по стимуляции термогенеза жировой ткани и перехода клеток белой жировой ткани в функциональное состояние бежевой описывают влияние малых молекул (Nie et al., 2017), в том числе поступающих с пищей жирорастворимых веществ (Zhao et al., 2021).

Нами предлагается использование аденоассоциированных вирусных векторов для тканеспецифичной экспрессии генов транскрипционных регуляторов и локальной активации термогенеза в белой жировой ткани. *Исследование было поддержано грантом РНФ №22-14-20046.*

Литература

1. Becher T, Palanisamy S, Kramer DJ et al. Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health. *Nature Medicine*. 27, 58–65 (2021).
2. Seale P, Conroe HM, Estall J et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 121(1), 96-105 (2011).
3. Nie B, Nie T, Hui X, Gu P, Mao L, Li K, Yuan R, Zheng J, Wang H, Li K, Tang S, Zhang Y, Xu T, Xu A, Wu D, Ding S. Brown Adipogenic Reprogramming Induced by a Small Molecule. *Cell Reports*. 18(3), 624-635 (2017).
4. Zhao D, Pan Y, Yu N, Bai Y, Ma R, Mo F, Zuo J, Chen B, Jia Q, Zhang D, Liu J, Jiang G, Gao S. Curcumin improves adipocytes browning and mitochondrial function in 3T3-L1 cells and obese rodent model. *Royal Society Open Science*. 8(3):200974 (2021).

АНАЛИЗ ЦИРКУЛЯЦИИ КОРОНАВИРУСОВ ИЗ ЛЕТУЧИХ МЫШЕЙ, ПОЙМАННЫХ В 2015 И 2021 ГОДУ НА СМЕЖНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Е.В. Корнеев¹, А. Е. Самойлов^{1,4}, И.В. Артюшин², А.П. Юзефович², С.М. Долотова³, Е.О. Ключникова⁴, В.А. Сбарцалья⁴, А.С. Гладких⁴, М.В. Сафонова⁵, Е.В. Пимкина⁶, В.Г. Дедков⁴, А.С. Сперанская^{1,2}

¹НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва; ²МГУ им. М.В. Ломоносова; ³Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный; ⁴Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург; ⁵Противочумный центр Роспотребнадзора, Москва; ⁶ЦНИИ эпидемиологии, Москва

Рукокрылые являются естественным резервуаром вирусов различных родов, включая коронавирусы. За последние несколько десятилетий коронавирусы стали причиной вспышек таких заболеваний, как тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), ближневосточный респираторный синдром (MERS-cov), Covid-19 (SARS-CoV-2). По этой причине мониторинг вирусной популяции в летучих мышах имеет практическую значимость для распространением потенциальных возбудителей зоонозов. В ходе геномного анализа материала фекалий летучих мышей, обитающих на территории Московской области, мы обнаружили короткие последовательности вирусных геномов длиной 250 и 460 п.н., встречающиеся у вирусов семейства Coronaviridae, а также полные геномы альфакоронавирусов и бетакоронавирусов. В 2015 году материал был получен от рукокрылых 7 видов в Московской области (Звенигородский район), а в 2021 году от 5 видов на территории Москвы, Московской области, в Ростове-на-Дону, Калуге и Йошкар-Оле. Нами были проведены высокопроизводительное секвенирование и ПЦР-скрининг на наличие в образце РНК альфакоронавирусов и бетакоронавирусов с использованием праймеров специфичных к гену репликазы (RdRp) семейства Coronaviridae. Сборку последовательностей по результатам секвенирования производили *de novo* с помощью SPAdes 3.15, анализ последовательностей проводили с помощью blastn против базы данных nt. По результатам анализа в 8 образцах фекалий рукокрылых, собранных в 2015 году в Московской области, были обнаружены короткие последовательности длиной ~500 п.н., относящиеся к вирусам семейств Coronaviridae (Alphacoronavirus, Betacoronavirus), также в одном образце *Pipistrellus nathusii* был обнаружен полный геном MERS-CoV-подобного бетакоронавируса. В 4 образцах, собранных в 2021 году, амплификация фрагмента гена RdRp коронавирусов с последующим секвенированием показала наличие коронавирусов в 4 образцах, при этом во всех 4 образцах обнаружен идентичный вариант RdRp. Генетически близкие альфакоронавирусы были выявлены у рукокрылых вида *P. kuhlii*, пойманных на территории Московской области и Ростова-на-Дону в 2015 и 2021 года. Полученные данные позволяют предположить длительную циркуляцию нескольких штаммов альфакоронавирусов на территории РФ. *Данная работа поддержана на РФФИ (20-04-60561\20).*

ПЦР-СХЕМА ПЕРВИЧНОГО СКРИНИНГА ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

М.А. Корниенко, Д.А. Беспятых, М.В. Малахова, Р.Б. Городничев, Н.С. Купцов, Е.А. Шитиков

ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Появление и распространение бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) – одна из главных угроз общественному здоровью в XXI веке. Преодолением кризиса антибиотикорезистентности может стать использование (бактерио)фагов для лечения инфекций, вызванных штаммами с МЛУ. Целью исследования являлась разработка схемы первичного скрининга фагов *S. aureus* и *K. pneumoniae*, потенциально пригодных для терапии.

Геномы фагов ($n = 749$) получены из базы NCBI RefSeq/GenBank. Аннотирование генов проводили с помощью Prokka. Таксономическое положение фагов определяли на основании ICTV Master Species List 2021 и с использованием vConTACT2. Тип взаимодействия фага с клеткой предсказан с помощью VACPHLIP. Анализ ортологичных генов проводили с помощью PIRATE, далее рассматривали гены с идентичностью $>60\%$ и средней длиной >400 п.н. ПЦР праймеры подбирали с помощью OLIGO. Валидацию праймеров проводили на коллекции фагов (стафилофаги ($n=6$); фаги клебсиелл ($n=15$)).

Для разработки схемы типирования проведен поиск таксон-специфических семейств ортологичных генов на выборке фаговых геномов. В результате анализа подобраны пары праймеров, способные идентифицировать два семейства вирулентных стафилофагов (Herelleviridae: f-GAATTAACCTTCTGGTGGGG r-ATACTTTTTCATCATAMGGTAA и Rountreeviridae: f-TCAATTTCCAAACATTAGCAG r-GGATTTACATCTTGGTCAGTA) и 11 родов вирулентных фагов клебсиелл (Przondovirus: f-CGTACAACCAAGGKAAGG r-TCCGTGAACACATCRTACCC, Taipeiivirus: f-AGTTCTGAACACCAAAAGGC r-CCAACTCAGAGCCGTTC, Drulisvirus: f-CGCTCCGTAACGATAAGATG r-ACGCAGACCGATGTTGTAC, Webervirus: f-CSTATGATGACGACTCAAAC r-ATTGCCAGCCATCTTATCAG, Jiaodavirus: f-TGAACATCAAAGCAATTCGTG r-AACCACAGAATGCCAGAATC, Sugarlandvirus: f-GATCTACCAAGCTGTCCAG r-AGTCGTTGTTACTCGTTCC, Slopekvirus: f-TCAAAGAACAATACGAAGAGG r-TTGCCATTGCTCCAGAGAG, Jedunavirus: f-ACTTCTATTGTCATGGCTGG r-CACSTTACAGTTTAGCGTG, Marfavirus: f-GCACCTGAAGGCATTACCC r-CCCATCAATAGATAAAGCAC, Mydovirus: f-GATCGAAAAGAATGTCTGGG r-TTGGTCTACGATAATATCACG и Yonseivirus: f-GCACGCCGACCTATCCCCG r-GCCACGGTCAATGATAAGC).

Описанная схема облегчит отбор фагов для дальнейшего изучения и их применение в терапевтических целях. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443>*

ОЦЕНКА ГУМОРАЛЬНОГО, Т-КЛЕТОЧНОГО И МУКОЗАЛЬНОГО ОТВЕТА НА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ COVID-19 НА МОДЕЛИ ИГРУНКОВЫХ ОБЕЗЬЯН (*CALLITHRIX JACCHUS*)

И.В. Гордейчук¹, А.И. Тухватулин², Е.О. Баюрова¹, С.А. Гуляев¹, А.С. Кондрашова¹, Д.В. Авдошина¹, А.В. Мороз¹, Т.В. Гуляева¹

¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита); ²НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва

Беспрецедентная в новейшей истории пандемия COVID-19 потребовала внедрения всех существующих вакцинных платформ с целью обеспечения доступности вакцин против COVID-19 для людей во всех странах мира. В ходе разработки вакцинных препаратов на доклиническом этапе важно было оценить их безопасность, иммуногенность и протективность. Для исследований протективности широко используются малые лабораторные животные модели, включая гуманизированных K18-ACE2 мышей, сирийских хомячков и норок. В то же время, лабораторные приматы позволяют провести наиболее адекватную оценку безопасности и иммуногенности вакцинных препаратов, включая моделирование всех звеньев иммунного ответа при применении различных вакцинных платформ и различных путях введения вакцин. В ходе данной работы были подобраны и оптимизированы методы оценки гуморального иммунного ответа, уровня антиген-специфической пролиферации Т-клеток, цитокинного профиля и мукозального иммунного ответа на вакцинацию против COVID-19 на модели игрунковых обезьян (*Callithrix jacchus*). Локусы главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I игрунок обладают ограниченной изменчивостью при относительно высокой частоте смены поколений, что приводит к низкому уровню различий иммунного ответа на инфекционные патогены и опухолевые антигены между отдельными представителями данного вида. Изменчивость локусов МНС класса II также весьма ограничена. В силу низкого уровня изменчивости иммунного ответа между отдельными животными, исследования иммуногенности на игрунковых обезьянах дают высоко воспроизводимые результаты, несмотря на аутбредную природу экспериментальных групп. Возможность содержания игрунковых обезьян в контролируемых лабораторных условиях в сочетании с оптимизированными иммунными тестами обусловили их широкое применение для оценки иммуногенности вакцинных препаратов против COVID-19.

ЭКЗОГЕННЫЕ МРНК, КОДИРУЮЩИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСОВ ГРИППА

М.А. Плотникова¹, С.А. Клотченко^{1,2}, А.А. Ложков^{1,2}, Е.А. Елпаева¹, В.В. Высочинская^{1,2}, А.В. Васин^{1,2}

¹НИИ гриппа им. А.А. Сморodinцева МЗ РФ; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Терапевтические антитела представляют собой одну из самых быстрорастущих областей фармацевтической промышленности. Предлагаемое научное исследование предполагает использование экзогенных мРНК, кодирующих антитела, для пассивной иммунизации.

Целью работы было получение и исследование трансляционной активности мРНК, кодирующих лёгкие и тяжёлые цепи рекомбинантных иммуноглобулинов против вируса гриппа А и В, методом *in vitro* транскрипции.

Для создания конструкций были выбраны два моноклональных антитела, одно из которых (клон 2/3) является типоспецифическим и выявляет нуклеопротеин вирусов гриппа В (получено в НИИ гриппа), второе — антитело FI6-VHv3, специфически распознаёт гемагглютинины различных подтипов вирусов гриппа А (впервые описано в работе Corti с соавт., 2011; конструкции с вариабельными областями любезно предоставлены Т.К. Алиевым, МГУ имени М.В. Ломоносова). Антитело FI6-VHv3 способно с разной эффективностью нейтрализовать различные подтипы вирусов гриппа типа А, в то время как антитело 2/3 не является нейтрализующим.

Тяжёлые и лёгкие цепи описанных антител были клонированы в экспрессионные векторы серии pIRES (neo3 и puro3), содержащих, наряду с CMV промотором, промотор фага T7, что позволяет проводить транскрипцию фрагмента *in vitro*. Общий дизайн конструкций, кодирующих тяжёлую цепь антитела, включал последовательность Козака, сигнальный пептид, вариабельную область и полноразмерные константные области IgG1 человека. Общий дизайн конструкций, кодирующих

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи

3–8 октября 2022

лёгкую цепь антитела, включал последовательность Козака, сигнальный пептид, вариабельную область и константную область IgG-карра человека.

Для синтеза РНК *in vitro* был использован набор mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit. Трансляционная активность полученных мРНК была исследована на клетках A549.

Согласно результатам ИФА в течение первых 10–12 часов после котрансфекции соответствующих мРНК в супернатантах клеток A549 наблюдалось накопление функциональных химерных антител. По истечении 12 часов уровень накопленных в супернатантах антител выходил на плато. Максимальная концентрация рекомбинантных антител в клеточных супернатантах составила около 15 нг/мл. *Работа выполнена в рамках Государственного задания Минздрава России № 056-00112-22-02 на 2022 год (Доп. соглашение от 31.05.2022 № 056-03-2022-112/2).*

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ АНТИМИКОТИКОВ И ДРУГИХ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ – ЭКСПРЕСС-ПРОТЕОМИКА НА ОСНОВЕ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И СКРИНИНГИ ПОЛНОГЕНОМНЫХ КОЛЛЕКЦИЙ МУТАНТОВ ДРОЖЖЕЙ

Э.Ш.М.О. Гази^{1,2,3}, В.А. Бидюк¹, Ф.Х. Ламердонова¹, Ф.Д. Рябов¹, И.Б. Левшин⁴, В.А. Макаров¹, Я.М. Станишевский², Л.А. Александрова⁵, М.О. Агафонов¹, А.И. Александров¹

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Институт биохимической технологии и нанотехнологии, Российский университет дружбы народов, Москва; ³Кафедра микробиологии, Фармацевтический факультет, Университет Танты, Египет; ⁴Институт по изучению новых антибиотиков имени Гаузе, Москва; ⁵Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, Москва

Грибковые патогены наносят значительный экономический ущерб в области сельского хозяйства, а также представляют огромную медицинскую проблему. В частности, более 1,5 млн человек каждый год умирают от грибковых инфекций. Поскольку грибы являются эукариотами, разнообразие эффективных противогрибковых средств является ограниченным, и в настоящее время происходит распространение лекарственно-устойчивых грибковых патогенов. В связи с этим, создание новых антимикотиков крайне актуально. Понимание механизмов действия новых эффективных антимикотиков крайне важно для оценки перспективности создания лекарственного препарата и его рационального дизайна. Пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются удобной моделью для характеристики механизмов действия антимикотиков. В частности, широкое применение нашли систематические коллекции дрожжевых мутантов. В нашей работе мы создали новый подход SCRAPPY (Single Cell Rapid Assay of Proteome Perturbation in Yeast), основанный на оценке изменения уровня GFP-меченых белков с помощью проточной цитометрии, для описания ответа клеток на воздействие различных веществ. На данный момент нами было охарактеризовано 8 классических антимикотиков, целый ряд известных ингибиторов различных клеточных процессов, а также более 10 веществ с неизвестным механизмом действия. Использование созданного подхода совместно с данными об устойчивости/чувствительности различных мутантов позволяют быстро сравнивать действие нового вещества с известными, и, в ряде случаев, выявлять новые, уникальные аспекты механизмов действия биологически-активных соединений. В частности, получены сведения о потенциальной защитной антиоксидантной функции остатков ароматических аминокислот в мембране, а также о преобладающей роли азольной компоненты при действии гибридного азольно-тиазолидинового антимикотика. Работа была поддержана грантами РФФ 21-74-10115 и 22-24-00756.

ПРОГРАММИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ЦЕЛЕВОЙ ДОСТАВКИ *IN VIVO*

А.П. Костюшева¹, С.А. Брезгин^{1,2}, Н.И. Пономарева^{1,2}, А. Пароди², В.С. Покровский³, Д.В. Соколова³, Е.О. Баярова⁴, М.В. Зюзин⁵, М.А. Абакумов^{6,7}, Л. Фатхутдинова⁵, С.В. Макаров⁵, Г.В. Максимов⁸, О.В. Слатинская⁸, И.В. Гордейчук⁴, А.А. Замятнин^{2,9,10,11}, В.П. Чуланов^{1,2}, Д.С. Костюшев^{1,2}

¹Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва; ²НТУ «Сириус», Сочи; ³НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ; ⁴Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва; ⁵Университет ИТМО, Санкт-Петербург; ⁶РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁷НИТУ «МИСИС», Москва; ⁸МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия ⁹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва; ¹⁰Department of Biosciences and Medicine, University of Surrey, Surrey, United Kingdom; ¹¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Биологические наночастицы (БН) секретируются различными линиями клеток, и представляют собой везикулы размером 50-150 нм, которые могут использоваться для упаковки и доставки лекарственных препаратов. К достоинствам БН относятся высокая биосовместимость, безопасность, отсутствие иммуногенности, а также возможность программирования свойств БН. Целевая доставка БН возможна в том числе за счет генетического программирования и экспонирования на поверхности наночастиц ткань-специфичных лигандов. В данной работе с помощью технологий генетического программирования поверхности, были разработаны системы доставки БН в печень, мозг и сердце. Получены генетические конструкции, кодирующие укороченный вариант тетраспанина CD63 с таргетирующими пептидами RVG (мозг) и АРОЕ (печень). Плазмиды трансфицировали в клетки НЕК293Т для получения функционализированных БН. Среду с БН отбирали каждые 24 часа в течение 2 суток. БН выделяли с помощью анионообменной хроматографии с этапом ультрафильтрации. Частицы характеризовали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, Рамановской спектроскопии, вестерн-блоттинга и по анализу среднего размера, распределения по размеру частиц и z-потенциала. Биораспределение функционализированных частиц, загруженных флуоресцентной меткой Су7, изучали с помощью технологии IVIS на модели мышей NUDE через 10, 30 и 60 минут после инъекции частиц в хвостовую вену. Оценку биораспределения наночастиц проводили по измерению уровней флуоресценции в легких, печени, мозге и почках. Показано, что полученные БН имеют средний размер 100-150 нм, z-потенциал -10 -20 мВ и типичную для БН чашеобразную морфологию. Было выявлено, что функционализация БН лигандом RVG способствует транспорту БН в мозг, увеличивая накопление флуоресцентного сигнала в мозгу с ~15% до ~35-40%. Функционализация БН лигандом АРОЕ увеличивала накопление БН в печени с ~20% до 40%. Таким образом, функционализация пептидами усиливает транспорт БН в мозг и печень, что позволяет использовать их для целевой доставки лекарственных средств *in vivo*. Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №20-15-00373.

ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНАЯ ТЕРАПИЯ КАК НОВЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ГЛИОМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА Г.В. Павлова^{1,2,3}, В.А. Колесникова¹, А.В. Ревещин¹, Д.Ю. Усачев², А.М. Копылов⁴

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН; ²НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко МЗ РФ;
³Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ; ⁴МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Глиобластома является одной из самых тяжелых форм опухолеобразования в организме человека с крайне неблагоприятным прогнозом. Встречаемость данной патологии составляет 3,5 случая на 100 000 населения ежегодно. Все известные методы лечения дают лишь незначительное увеличение времени жизни пациента. Гетерогенная структура глиобластомы с aberrантной регуляцией клеточной пролиферации позволяет опухоли выживать при различных терапевтических воздействиях. Помимо цитотоксических подходов терапии следует рассмотреть другие варианты воздействия на глиобластому человека. Нами предложено стимулировать «созревание» опухолевых клеток, что приведет к потере их пролиферативного потенциала. Для оценки возможности регулировать пролиферативный и дифференцировочный потенциал опухолевых клеток глиобластомы создана коллекция первичных и перевиваемых клеточных культур из опухолевой ткани пациентов. Возможность объединения молекулярно-генетических характеристик клеток этой коллекции с данными МРТ и ПЭТ для исходной опухоли позволяет лучше понять происхождение глиом головного мозга. Предложен принципиально новый подход к лечению глиомы – «дифференцировочная терапия», который основан на цитостатическом воздействии на клетки G-квадруплексом biG3T, обладающим антипролиферативной активностью, в комбинации с молекулами-индукторами, управляющими каскадами нейрогенеза - SB431542, LDN-193189, Putmorphamine, BDNF. Молекулы-индукторы SB431542, LDN-193189, Putmorphamine, BDNF используют для воздействия на каскады индуцированных плюрипотентных клеток и (ИПСК) для их дифференцировки в нейроны. При временном снижении пролиферативной активности опухолевых клеток после воздействия G-квадруплекса, молекулы-индукторы способны остановить деление клеток опухоли и направить их дифференцировку в зрелое состояние. Дифференцировочная терапия оказывается эффективной и для опухолевых стволовых Nestin, PROM1(CD133)-позитивных клеток, устойчивых к химиотерапии и лучевой терапии. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 075–15–2020–809 (13.1902.21.0030)).

ОЦЕНКА ГЕТЕРОГЕННОСТИ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ HerG2

В.А. Арзумян, М.А. Пятницкий, Е.В. Поверенная, Е.А. Пономаренко

НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Считается, что клеточные линии имеют относительно воспроизводимый молекулярный профиль, что позволяет сопоставлять полученные результаты на конкретных линиях между собой. Молекулярные профили клеточных линий воспроизводимы и уникальны, что позволяет идентифицировать конкретную клеточную линию. Несмотря на заявленную молекулярную «стабильность» клеточных линий, недавнее широкомасштабное исследование клеточной линии HeLa показало, что клеточные линии, принадлежащие к одному типу, могут существенно отличаться между собой по геномному и транскриптомному профилю (Liu Y. et al, 2019). Опухолевая клеточная линия HerG2 одна из часто используемых клеточных линий в качестве модели для исследования метаболизма лекарств, раковых процессов и др. Таким образом, для корректного использования опухолевой клеточной линии HerG2 в качестве модели необходимо проверить ее гетерогенность на различных молекулярных уровнях. Целью данного исследования является оценка воспроизводимости геномного и транскриптомного профилей опухолевой клеточной линии HerG2. Для оценки гетерогенности клеточной линии HerG2 были загружены опубликованные данные из базы данных NCBI SRA. Данные RNA-Seq отбирались со следующими критериями: количество прочтений > 20 миллионов, средняя длина прочтений > 50, выполненных по технологии Illumina. Геномные данные: количество прочтений > 100 миллионов, средняя длина прочтений > 50, выполненных по технологии Illumina. В результате было отобрано 15 образцов RNA-seq и 7 образцов WGS. При расчете экспрессии методом Salmon была выявлена низкая корреляция как экспрессии генов, так и транскриптов для образцов линии HerG2. В результате анализа мутаций суммарно было обнаружено 9784 nsSNP (несинонимичные однонуклеотидные замены) и 4455 INDELS. Во всех образцах встречалось лишь 526 nsSNP и 29 INDELS. Таким образом, в случае анализа транскрибируемых мутаций наблюдается высокая гетерогенность. Наблюдаемая гетерогенность клеток HerG2 должна быть учтена при проведении протеогеномных и протеотранскриптомных исследованиях. Данная работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 20-14-00328.

ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Е.С. Потехина^{1,2}, Д.Ю. Басс^{1,2}, А.В. Иваненко^{1,2}, Д.А. Корженевский³, А.М. Нестеренко³, А.Е. Карнаева⁴,
Н.Ф. Закирова⁵, А.В. Иванов⁵, Л.Е. Шимолина⁶, М.В. Ширманова⁶, В.В. Белоусов^{1,2,3}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; ³Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва; ⁴Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН; ⁵Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; ⁶Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород

Нарушения транспорта пирувата в митохондрии и его окисления наблюдаются при многих типах рака. Стимуляция окислительного метаболизма способна замедлять рост опухолей. Чтобы оценить влияние внутримитохондриальной концентрации пирувата на раковые клетки, мы разрабатываем инструмент для её регуляции на основе дегидрогеназы D-аминокислот (DadA) из *Pseudomonas aeruginosa*. Этот FAD-зависимый фермент окисляет D-аланин до пирувата и аммиака. Поскольку D-аланин практически отсутствует в клетках млекопитающих, активность DadA контролируется добавлением субстрата извне. При добавлении раствора D-аланина к клеткам, экспрессирующим DadA с локализацией в матриксе митохондрий, мембранный потенциал митохондрий, скорость потребления кислорода и внутриклеточные количества интермедиатов цикла Кребса увеличивались по сравнению с исходным значением и с контролем (мутантный вариант DadA, не обладающий ферментативной активностью). При этом активность DadA не приводила к накоплению пероксида водорода или

нениям pH в матриксе митохондрий. В панели протестированных раковых клеток также увеличивалась внеклеточная концентрация пирувата, а внеклеточная концентрация лактата, скорость гликолиза и концентрация пирувата в цитоплазме и митохондриях в физиологических условиях не изменялись. Было показано, что накапливаемый внеклеточный пируват образуется из D-аланина в результате активности DadA. При этом активность DadA не влияла на скорость деления раковых клеток в культуре. Чтобы оценить влияние активности DadA на развитие опухолей, использовали модель подкожных ксено-трансплантатов меланомы человека Lu451 в иммунодефицитных мышцах линии Nude. Клетки меланомы экспрессировали DadA с митохондриальной локализацией и люциферазу светлячка. Животные получали D-аланин с водой. Активность DadA замедляла рост опухолей, при этом потребление D-аланина не повлияло на рост опухолей в контрольной группе с экспрессией неактивной DadA. Полученные данные позволяют предположить, что активность DadA ускоряет митохондриальный метаболизм. При этом опухолевые клетки используют компенсирующий механизм, позволяющий им выводить излишки пирувата из матрикса во внеклеточное пространство. Тем не менее, полученного изменения метаболизма достаточно, чтобы замедлить рост опухолей *in vivo*.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОналиЗИРОВАННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ НА МОДЕЛЯХ РАКА ГРУДИ И РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ *IN VITRO* И *IN VIVO*

С.А. Брезгин^{1,2}, А.П. Костюшева¹, Н.И. Пономарёва^{1,2}, А. Пароди², В.С. Покровский³, Д.В. Соколова³, Е.О. Бажурова⁴, М.В. Зюзин⁵, М.А. Абакумов^{6,7}, Л. Фатхутдинова⁵, С.В. Макаров⁵, Г.В. Максимов⁸, О.В. Слатинская⁸, А.С. Фролова^{2,9}, В.П. Чуланов^{1,2}, Д.С. Костюшев^{1,2}, А.А. Замятнин^{2,9,10,11}

¹Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва; ²НТУ «Сириус», Сочи; ³НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва; ⁴Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва; ⁵Университет ИТМО, Санкт-Петербург; ⁶РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁷НИТУ «МИСиС» Москва; ⁸МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва; ¹⁰Department of Biosciences and Medicine, University of Surrey, Surrey, United Kingdom; ¹¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

В структуре смертности по всему миру, онкопатологии занимают второе место. Химиотерапия уменьшает размер опухоли, но имеет высокую системную токсичность. Перспективным методом снижения системной токсичности и увеличения эффективности является упаковка химиопрепаратов в биологические наночастицы, функционализированные пептидами к опухолевым маркерам. На основе биологических наночастиц разработать системы целевой доставки в клетки рака груди и рака предстательной железы. С помощью молекулярного клонирования были созданы конструкторы для поверхностной экспрессии таргетирующего пептида к рецептору EGFR (рак груди) и PSMA (рак предстательной железы). Наночастицы получали из клеток НЕК293Т. Характеризацию наночастиц проводили методами электронной микроскопии, динамического светорассеяния, поверхностно-усиленного рамановского светорассеяния (SERS) и вестерн-блоттинга. Эффективность целевой доставки *in vitro* оценивали на клетках SKBR3 и 22RV1 с флуоресцентно-мечеными частицами. Оценку биораспределения наночастиц *in vivo*, с помощью технологии IVIS, оценивали на мышах NUDE с опухолями клеток SKBR3 и 22RV1. Выделенные наночастицы имели характерную морфологию и спектр SERS, стандартное распределение по размеру (средний размер ~100 нм). При обработке клеток SKBR3 функционализированными наночастицами наблюдалось увеличение захвата частиц клетками в ~2.7-3.7 раз по сравнению с контрольными наночастицами, а при обработке 22RV1 в ~3.7-9.7 раз, соответственно. В экспериментах *in vivo*, на мышах с опухолями SKBR3 после введения функционализированных частиц сигнал в области опухоли составлял 38.3±4.6% от общего сигнала, в то время как для контрольных частиц сигнал составлял 23.3±10.3%. В экспериментах на модели 22RV1 сигнал для наночастиц составил 45.2±13.4%, а для контрольных частиц – 26.7±9.0%. Функционализация биологических наночастиц таргетирующими пептидами увеличивает тропность частиц к опухолевым клеткам в ~3-10 раз, а на моделях поздних стадий рака груди и предстательной железы *in vivo* на 15-20%. Работа выполнена при поддержке РФФИ №21-75-30020.

ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ p53 НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВОГО ДОНОРА И БОЛЬНОГО РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

И.А. Ганеева, А.Х. Валиуллина, Е.А. Змиевская, Э.Р. Булатов
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Рассеянный склероз (РС) - хроническое аутоиммунное заболевание, поражающее миелиновую оболочку нервных волокон спинного и головного мозга. Эффективная терапия РС остается сложной и до конца нерешенной биомедицинской задачей. В связи с этим актуальным является поиск перспективных терапевтических мишеней для лечения данного заболевания. Несмотря на то, что роль p53 в аутоиммунных заболеваниях была продемонстрирована на ряде моделей многие функции p53 в регуляции РС до сих пор детально не изучены. В данном исследовании мы проводим оценку влияния активации p53 при инкубации с Nutlin-3a на секрецию цитокинов иммунными клетками здорового донора и пациента с РС. Материалы и методы. В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), выделенные из цельной крови здорового донора и больного РС. МКПК от каждого донора были разделены на 3 группы: необработанные, обработанные 10 мкМ или 40 мкМ Nutlin-3a в течение 24 часов. Мы оценили уровни экспрессии генов p21, Вах, PUMA с помощью ОТ-ПЦР. Провели цитофлуориметрический анализ клеток с окрашиванием антителами на ряд В- и Т-клеточных маркеров (CD45, CD3, CD4, CD20), а также антителами к белку p53 (внутриклеточно). Цитокиновый профиль в супернатантах инкубированных клеток оценили мультиплексным анализом с использованием проточного лазерного анализатора Bio-Plex 200 (Bio-Rad). Результаты и заключение. Анализ ОТ-ПЦР показал повышение уровня экспрессии p53-зависимых генов (p21, Вах, PUMA)

при инкубации с Nutlin-3a. При проведении цитофлуориметрического анализа МКПК было выявлено повышение доли p53 положительных T- и В-клеток как у здорового донора, так и у больного РС после воздействия Nutlin-3a. При этом соотношение проанализированных популяций иммунных клеток значительно не изменилось. По данным анализа цитокинового профиля в клетках здорового донора Nutlin-3a повышал уровень IP-10, снижал уровни IL-10, G-CSF, MCP-1, TNF- α , VEGF и не влиял на уровни IL-1b, IL-1ra, IL-15, INF- γ , RANTES. В клетках больного РС Nutlin-3a повышал уровни IL-1b и TNF- α , снижал IL-1ra, IL-10, G-CSF, VEGF и не влиял на IL-15, INF- γ , IP-10, MCP-1, RANTES. Модулирование секреции цитокинов в МКПК под действием Nutlin-3a позволяет предположить участие белка p53 в регуляции иммунных процессов, связанных с РС.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСГЛУТАМИНАЗЫ ВТОРОГО ТИПА В КАЧЕСТВЕ МИШЕНИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ РАКА ЛЕГКОГО

Ю.А. Гненная¹, Н.А. Барлев^{1,2}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; ²НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Терапия поздних стадий немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) предусматривает прием высокотоксичных доз доксорубина и цисплатина, имеющих сильный побочный эффект. Таким образом, не теряет актуальности поиск новых молекулярных мишеней для таргетной терапии, способствующей повышению сенсibilизации клеток опухоли к химиопрепаратам. Трансглутаминаза второго типа (TG2) является мультифункциональным ферментом, нарушения в работе которого приводят к развитию злокачественных опухолей различного происхождения. Известно, что одним из интерактантов TG2 является транскрипционный фактор p53. Кроме того, недавно сообщалось, что TG2 способствует ингибированию индуцированного цисплатином апоптоза в клетках рака яичников, что указывает на возможное участие TG2 в регуляции клеточного транспорта химиотерапевтических препаратов. Известно, что TG2 опосредованно регулирует RLP76, белок ионных каналов, через которые доксорубин выводится из клетки. RLP76 также может образовывать комплекс с p53, который ингибирует транспортную активность RLP76, тем самым сенсibilизируя раковые клетки к апоптозу. Таким образом, целью данного исследования является изучение механизма TG2-опосредованной лекарственной устойчивости в контексте модуляции активности онкосупрессора p53. Исследования проводились на клеточных линиях (A549 и H1975) с разным статусом p53 (дикий тип/мутант, соответственно), из которых, с помощью молекулярно-генетических подходов, были получены нокаутные и оверэкспрессирующие TG2 соответствующие клеточные линии. Методами иммуноблоттинга и ОТ-ПЦР было продемонстрировано изменение уровня только p53 дикого типа и его белков-мишеней в зависимости от статуса TG2. При помощи RTCA xCelligence eSight, МТТ- и клонногенного тестов было показано, что клетки A549 с нокаутом TG2 оказались более чувствительны к обработке доксорубином. Наоборот, клетки H1975, сверхэкспрессирующие TG2, оказалась более резистентными к доксорубину в течение 24 ч, но в условиях длительной обработки выживаемость клеток оказалась снижена. Возможно, данный эффект связан с влиянием TG2 на активность RLP76. Дальнейшие исследования предполагают подробное изучение возможности существования комплекса TG2-p53-RLP76 и его влияния на выживаемость раковых клеток. *Работа проводилась в рамках выполнения Программы фундаментальных научных исследований в РФ на долгосрочный период (ИБМХ им. Ореховича).*

ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ АТМОСФЕРНОЙ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЕННОЙ СТРУИ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

О.А. Коваль^{1,2}, М.М. Бирюков^{1,2}, Е.А. Патракова^{1,2}, О.С. Троицкая¹, Е.В. Милахина^{3,4}, Д.В. Семенов¹, П.П. Гугин⁴, Д.Э. Закревский^{3,4}, И.В. Швейгер⁵

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²Новосибирский государственный университет; ³Новосибирский государственный технический университет; ⁴Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН; ⁵Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН, Новосибирск

Воздействие на солидные опухоли струей холодной плазмы (ХПС) является инновационным подходом, который активно начали разрабатывать лишь в последнее десятилетие. Вследствие этого актуальны исследования, направленные на выявление условий селективности такого воздействия на опухолевые клетки, в том числе в составе 3D клеточных моделей, имитирующих злокачественные новообразования. Холодная плазма - ионизированный газ, состоящий из заряженных частиц, активных незаряженных частиц, электрического поля и УФ-излучения. Основные эффекты ХПС при облучении биоматериала обусловлены активными формами азота и кислорода, генерируемыми в плазменной струе.

Одной из решаемых в исследовании задач была оптимизация параметров облучения, при которых возможна селективность цитотоксического воздействия струи по отношению к опухолевым клеткам, в том числе обработанным наночастицами золота (AuNPs) и наночастицами, конъюгированными с PEG. Проведены пилотные эксперименты по исследованию изменения проникновения AuNP и AuNP-PEG в опухолевые и здоровые клетки человека в результате облучения ХПС для разработки новых противоопухолевых подходов – на примере клеток аденокарциномы легкого и увеальной меланомы.

В рамках исследования механизма активации гибели клеток при воздействии ХПС, анализ транскриптома облученных клеток показал вовлеченность генов-регуляторов перехода из G1 в S фазу клеточного цикла в ответ на облучение. Электронная микроскопия облученных клеток показала, что облучение незначительно изменяет структуру ядрышек. Вестерн блот анализ образцов облученных здоровых и опухолевых клеток выявил различия в белках ЭПР, участвующих в ответе катализатора на окислительный стресс – глутатион пероксидаз 7 (GrX7) и 4 (GrX4), а также металлопротеиназы -3 и -7 (MMPs). Облучение многоклеточных опухолевых сфероидов вело к их деструкции на отдельные клетки с активацией в них процессов гибели.

В экспериментах *in vivo* мы продемонстрировали, что облучение ХПС подкожно растущих опухолей глиобластомы человека U87MG приводит к торможению роста опухоли при использовании в системе заземленной подложки. Таким образом, предложены подходы, ведущие к усилению противоопухолевого воздействия холодной плазменной струи. *Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-49-08003.*

ТРЕХМЕРНАЯ МОДЕЛЬ РМЖ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК MCF7, ГИПЕРЭКСПРЕССИРУЮЩИХ EGFR

Д.Д. Новак^{1,2}, О.С. Троицкая², А.А. Нуштаева², М.Е. Варламов^{1,2}, М. М. Абдурахманова^{1,2}, О.А. Коваль^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия; ²Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

Факторы роста и их рецепторы регулируют автономный рост злокачественных опухолей. Хотя рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) присутствует в нормальных клетках, показано, что он гиперэкспрессируется в различных линиях опухолевых клеток. EGFR играет важную роль в устойчивости опухолей к химиотерапии и лучевой терапии, в связи с чем наличие EGFR свидетельствует о неблагоприятных прогнозах при РМЖ. Моделью, позволяющей исследовать эффективность противоопухолевых препаратов, таргетных к EGFR, может стать пара клеточных линий, отличающихся только экспрессией EGFR. Целью работы являлось получение и характеристика линии клеток аденокарциномы молочной железы MCF7, гиперэкспрессирующей EGFR человека. На основе линии клеток MCF7 дикого типа с низким уровнем EGFR методом ретровирусной трансдукции была получена линия клеток MCF7-EGFR. Показано, что уровень EGFR в клетках MCF7-EGFR увеличился в 6.5 раз по сравнению с клетками дикого типа. Установлено, что гиперэкспрессия EGFR в клетках MCF7 приводит к спонтанному сферообразованию в стандартных условиях культивирования. Гистологический анализ сфероидов MCF7-EGFR показал наличие некротического ядра в центре крупных сфероидов. В сфероидах MCF7-EGFR хорошо визуализируются белок плотных контактов ZO-1 и белок межклеточной адгезии E-кадгерин, которые участвуют в негативной регуляции клеточной миграции и могут способствовать сферообразованию. Показано, что часть клеток сфероидов MCF7-EGFR теряют рецепторы HER2 и HER3. Установлено, что в сфероидах MCF7-EGFR увеличивается популяция клеток с фенотипом CD24-Low/CD44-Low и уменьшается популяция клеток с фенотипом CD24+/CD44+ по сравнению с клетками дикого типа. Применение таргетного к EGFR цитотоксического препарата цетуксимаб снижает жизнеспособность клеток сфероидов и стимулирует их распад. Таким образом, сфероиды MCF7-EGFR являются моделью, позволяющей исследовать эффективность противоопухолевых препаратов, таргетных к EGFR. *Работа поддержана грантом РФФ № 20-74-10039 и частично грантом Правительства НСО за 2022 г. (№ Гр-7).*

СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ, «ЦИФРОВОЙ ЧЕЛОВЕК», И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

А.Н. Колодкин^{1,2,3}

¹Luxembourg Institute of Health, Luxembourg, Luxembourg, EU; ²Luxembourg Centre for Systems Biomedicine, University of Luxembourg, Esch-sur-Alzette, Luxembourg, EU; ³Infrastructure Systems Biology Europe, Amsterdam, the Netherlands

Остается загадкой, как биохимические процессы, протекающие во временной шкале измеряемой в часах и минутах, могут вызывать развитие болезни Паркинсона, связанной с преждевременной гибелью дофаминергических нейронов во временной шкале, измеряемой годами, и каким образом нарушения в защите от окислительного стресса могут ускорять этот процесс. Целью настоящей работы была разработка математической модели для понимания развития нейродегенеративных заболеваний и роли активных форм кислорода в этом процессе. Математическая модель, описывающая влияние окислительного стресса при развитии болезни Паркинсона, была создана в Люксембургском Центре Системной Биомедицины (LCSB, Люксембург) в сотрудничестве с German Cancer Research Center (DKFZ, Хайделберг), Free University Amsterdam (VU) и Institute for Systems Biology (ISBE, Сиэтл). Модель была параметрирована с использованием независимо полученных экспериментальных данных из Maastricht University (MA, Маастрихт) и University Milano-Bicocca (Милан) и адаптирована к персонализированной терапии болезни Паркинсона. Модель и ее описание доступны на сайте FAIRDOMHub [1]. Созданная модель позволяет связать процесс старения с некоторыми факторами, участвующими в развитии болезни Паркинсона [2,3]. Например, недостаток белка DJ-1 или увеличение количества α -синуклеина, ускоряли старение, в то время как антиоксиданты или кофеин замедляли его. Мы предложили вычисление коэффициента контроля времени старения и обнаружили, что 25 из 57 промоделированных молекулярных процессов могут влиять на скорость старения, что создает предпосылки для разработки персонализированной терапии болезни Паркинсона.

Литература

1. Kolodkin, A., et al, (2020). ROS networks, FAIRDOMHub. <http://doi.org/10.15490/FAIRDOMHUB.1.INVESTIGATION.399.3>
2. Kolodkin, A.N. et al, ROS networks: designs, aging, Parkinson's disease and precision therapies. *NPJ Syst Biol Appl* 6, 34 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41540-020-00150-w>
3. Sharma, R.P., Kumar, V., Schuhmacher, M., Kolodkin, A.N., Westerhoff, H.V., Development and evaluation of a harmonized whole body physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for flutamide in rats and its extrapolation to humans, *Environmental Research* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108948>

ХЕМОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК Е.С. Потехина^{1,2}, Д.Ю. Басс^{1,2}, А.В. Иваненко^{1,2}, Д.А. Корженевский³, А.М. Нестеренко³, А.Е. Карнаева⁴, Н.Ф. Закирова⁵, А.В. Иванов⁵, Л.Е. Шимолина⁶, М.В. Ширманова⁶, В.В. Белоусов^{1,2,3}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; ³Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва; ⁴Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН; ⁵Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва; ⁶Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород

Нарушения транспорта пирувата в митохондриях и его окисления наблюдаются при многих типах рака. Стимуляция окислительного метаболизма способна замедлять рост опухолей. Чтобы оценить влияние внутримитохондриальной концентрации пирувата на раковые клетки, мы разработали инструмент для её регуляции на основе дегидрогеназы D-аминокислот (DadA) из *Pseudomonas aeruginosa*. Этот FAD-зависимый фермент окисляет D-аланин до пирувата и аммиака. Поскольку D-аланин практически отсутствует в клетках млекопитающих, активность DadA контролируется добавлением субстрата извне. При добавлении раствора D-аланина к клеткам, экспрессирующим DadA с локализацией в матриксе митохондрий, мембранный потенциал митохондрий, скорость потребления кислорода и внутриклеточные количества интермедиатов цикла Кребса увеличивались по сравнению с исходным значением и с контролем (мутантный вариант DadA, не обладающий ферментативной активностью). При этом активность DadA не приводила к накоплению пероксида водорода или изменениям pH в матриксе митохондрий. В панели протестированных раковых клеток также увеличивалась внеклеточная концентрация пирувата, а внеклеточная концентрация лактата, скорость гликолиза и концентрация пирувата в цитоплазме и митохондриях в физиологических условиях не изменялись. Было показано, что накапливаемый внеклеточный пируват образуется из D-аланина в результате активности DadA. При этом активность DadA не влияла на скорость деления раковых клеток в культуре. Чтобы оценить влияние активности DadA на развитие опухолей, мы использовали модель подкожных ксенотрансплантатов меланомы человека Lu451 в иммунодефицитных мышках линии Nude. Клетки меланомы экспрессировали DadA с митохондриальной локализацией и люциферазу светлячка. Животные получали D-аланин с водой. Активность DadA замедляла рост опухолей, при этом потребление D-аланина не повлияло на рост опухолей в контрольной группе с экспрессией неактивной DadA. Полученные данные позволяют предположить, что активность DadA ускоряет митохондриальный метаболизм. При этом опухолевые клетки используют компенсирующий механизм, позволяющий им выводить излишки пирувата из матрикса во внеклеточное пространство. Тем не менее, полученного изменения метаболизма достаточно, чтобы замедлить рост опухолей *in vivo*.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СТАБИЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ИММУНОАКТИВАТОРНЫХ МОЛЕКУЛ В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ НА ПРИВИВАЕМОСТЬ И РОСТ ОПУХОЛИ В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ

О.А. Ракитина¹, А.И. Кузьмич^{1,2}, Д.А. Дидыч¹, С.А. Кондратьева¹, О.А. Безбородова¹, В.В. Плешкан^{1,2},
И.В. Алексеенко^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Институт молекулярной генетики, НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Активация противоопухолевого иммунного ответа (ПИО) способна приводить к полной ремиссии пациентов, как нередко наблюдается при терапии ингибиторами иммунных контрольных точек (ИКТ). Для активации противоопухолевого иммунитета также могут использоваться различные иммуноактиваторные (ИА) молекулы, к которым относятся, например, ко-стимуляторы активации Т-клеток (OX40L, 4-1BBL и др.) и цитокины (IL2, IL18 и др.). Основным недостатком существующих подходов, направленных на активацию иммунного ответа, являются серьезные побочные эффекты, уменьшить которые можно с помощью внутриопухолевой ген-иммунной терапии. Моделью генотерапевтического воздействия являются раковые клетки, стабильно экспрессирующие молекулу интереса. Целью данной работы было изучить влияние стабильной экспрессии двух ИА молекул, OX40L и IL18, на рост опухолей СТ26. Нами были созданы лентивирусные векторы, несущие бицистронные каскады иммуноактиватор-IRES2-EGFP под контролем клеточного промотора PCNA. Клетки мышшиного colorectalного рака СТ26 были трансдуцированы полученными лентивирусами, модифицированные клетки отобраны с помощью FACS по свечению EGFP. В результате было получено 3 линии раковых клеток: контрольная СТ26-EGFP, СТ26-IL18-EGFP и СТ26-OX40L-EGFP. Полученные клеточные линии были охарактеризованы по экспрессии EGFP и OX40L (проточная цитометрия), а также скорости деления. Экспрессия EGFP и скорость деления клеток были сопоставимы для всех 3 групп, экспрессия OX40L наблюдалась в 95.2% клеток линии СТ26-OX40L-EGFP. Полученные клетки подкожно прививали мышам BALB/c, после чего отслеживали частоту появления опухолей и скорость их роста. В группах EGFP и OX40L опухоли развились у 100% мышей, однако, через некоторое время в группе OX40L наблюдалась резорбция опухолей у 33% животных. В группе IL18 опухоли развились у 75% животных, через некоторое время для 66% из них наблюдалась полная резорбция. Наблюдаемая отложенная резорбция сформировавшихся опухолей может быть опосредована развитием ПИО. Таким образом, было выявлено, что стабильная экспрессия генов OX40L и IL18 подавляет рост опухолей СТ26, причем такое подавление более эффективно при использовании цитокина IL18. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00806, <https://rscf.ru/project/22-25-00806/>

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ САРТ-ТЕРАПИИ

А.Р. Рахматуллина, М.А. Золотых, А.Х. Валиуллина, А.А. Ризванов, Э.Р. Булатов, Р.Р. Мифтахова
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Низкая эффективность САРТ-терапии при солидных опухолях связана с наличием опухолевого микроокружения, проявляющего иммуносупрессивные свойства. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) – ключевые клетки микроокружения, стимулируют выработку белков внеклеточного матрикса и цитокинов, ограничивая при этом подвижность Т-клеток. Цель

работы – оценить эффективность CART-клеток на модели опухолевых сфероидов, полученных в присутствии и отсутствии МСК. Материалы и методы. CART клетки были получены путём трансдукции Т-лимфоцитов лентивирусным вектором CD19-CART-RIAD. Сфероиды были получены из клеток аденокарциномы предстательной железы, гиперэкспрессирующих CD-19 (PC3M-CD19), и при совместном культивировании иммортализованных мезенхимальных стромальных клеток (иМСК) и клеток PC3M-CD19 (гетерогенные сфероиды). Через 7 дней после начала культуры к тестовым чашкам было добавлено 1×10^6 CART-клеток. Через 6 и 24 часа после добавления CART был проведен анализ морфологии сфероидов и анализ жизнеспособности клеток методом проточной цитофлуориметрии с использованием аннексина-V/7AAD. Результаты. Кратковременная 6-часовая инкубация опухолевых и гетерогенных сфероидов с CART не приводит к изменению морфологии и целостности сфероидов. При 24-часовой инкубации наблюдается значительная деградация как опухолевых, так и гетерогенных сфероидов PC3M-CD19-иМСК. Также длительная инкубация с CART сказывается на жизнеспособности опухолевых клеток. При этом снижение жизнеспособности опухолевых клеток через 24 часа составило $3,3 \pm 2,5\%$ для модели опухолевых сфероидов и $16,9 \pm 1,2\%$ для модели гетерогенных сфероидов. Выводы. Несмотря на многочисленные данные об иммуносупрессивных свойствах компонентов микроокружения опухоли, последние результаты свидетельствуют о способности МСК, секретирующих IL7 и IL12, стимулировать CART-клетки и улучшать противоопухолевую активность на мышиных моделях (Hombach 2020). Высокая эффективность CART-терапии на модели гетерогенных сфероидов может свидетельствовать о возможном влиянии мезенхимальных стромальных клеток на миграцию и активность CART-клеток. *Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и при финансовой поддержке гранта РФФИ №19-74-20026.*

γ-H2AX КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МАРКЕР РАЗВИТИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

М.А. Золотых¹, Д.У. Гафурбаева¹, А.Р. Рахматуллина¹, Ю.В. Филина¹, С.О. Генинг¹, А.Р. Сагъдеева¹, А.А. Ризванов¹, Р.Р. Мифтахова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; Ульяновский государственный университет, Ульяновск

Активация пути ответа на повреждение ДНК (DDR-сигнального пути) в клетке происходит посредством последовательных фосфорилирований сигнальных белков. Фосфорилирование варианта H2A.X гистона H2A по четырем остаткам серина от С-конца (остаток 139) с образованием γ-H2AX является одним из самых ранних событий в ответ на повреждение ДНК. Методы. Исследование проводилось на образцах клеточных лизатов пациентов с раком яичника до начала лечения и после терапии. На основании клинических параметров были сформированы группы пациентов с платино-чувствительной (n=5) и резистентной (n=6) формами РЯ, а также контрольная группа здоровых добровольцев (n=4). Были проанализированы уровни белков DDR-сигнального пути: ATR, фосфорилированного Ser345 Chk1, фосфорилированного Thr68 Chk2, фосфорилированного Ser139 H2A.X, MDM2, p21 и фосфорилированного Ser15 p53. Мультиплексный анализ проводили с помощью набора MILLIPLEx® DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead Panel - Cell Signaling Multiplex Assay (кат. номер 48-621MAG, Merck, Германия). Стандарты и образцы анализировали на устройстве Luminex MAGPIX (Luminex, США) с использованием программного обеспечения xPONENT (версия 4.2, Millipore, США). Статистическая обработка результатов проводилась с применением программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.1. Оценку экспрессии белков DDR-сигнального пути проводили методом межгруппового дисперсионного анализа. Результаты. Достоверные различия уровня γ-H2AX наблюдались в группе пациентов с платино-резистентной формой РЯ (p=0,0052). Было отмечено увеличение уровня фосфорилирования H2AX у пациентов до начала лечения по сравнению с контрольной группой (p=0,0096) и снижение по завершении терапии (p=0,0136). В группе пациентов, чувствительных к препаратам платины, достоверных различий выявлено не было (p=0,1096). Снижение уровня γ-H2AX может свидетельствовать об уменьшении количества повреждений, возникающих в следствие действия химиотерапевтических агентов, и являться прогностическим фактором развития химиотерапевтической резистентности. Выводы. γ-H2A.X может быть рассмотрен как потенциальный биомаркер химиотерапевтической резистентности при РЯ. *Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030)*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСОСОМ МОЛОКА ДЛЯ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА В КУЛЬТУРУ КЛЕТОК MCF-7

В.А. Черенко^{1,2}, С.Е. Седых^{1,2}, Г.А. Невинский^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет; ²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Рак молочной железы – одна из ведущих причин смертности среди женщин. Особенности рака молочной железы являются: агрессивное поведение опухоли, раннее метастазирование, развитие устойчивости к существующим химиотерапевтическим агентам и, как следствие, высокий уровень смертности. Доксорубин (Dox) является мощным противоопухолевым препаратом и одним из самых эффективных средств для лечения рака молочной железы. Целью настоящего исследования была оценка эффективности использования экзосом молока в качестве средства доставки лекарственного препарата. Полученные результаты показали, что Dox при загрузке в экзосомы молока (Exo) показывает повышение цитостатической активности в отношении клеточной культуры аденокарциномы молочной железы MCF-7. Анализ выживаемости клеток методом МТТ показал более высокую антипролиферативную активность при введении комбинированного препарата ExoDox, в сравнении с Dox (IC50 9,2 нМ) в культуру чувствительных к цитостатикам клеток рака молочной железы. Повышенная эффективность препарата, по нашему мнению, обусловлена более высоким потреблением клетками ExoDox и, таким образом, таргетной доставкой цитостатика. Анализ МТТ показал, что Dox и ExoDox ингибируют рост клеточной культуры на 43% и 73% соответственно, эффект значительно увеличивается комбинированием препарата экзосом молока и доксорубина. Также проведен анализ влияния Dox, Exo и ExoDox на экспрессию генов-маркеров апоптоза: Bcl-2, BAX и p53. Показано,

что Dox снижает экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2. Согласно литературным данным и полученным нами результатам, Dox активирует апоптоз, индуцируя работу генов семейства Bcl-2 в линии клеток MCF-7. Результаты также показали, что Dox индуцировал апоптоз путем регуляции Bax, p53 и подавления экспрессии белка Bcl-2. Таким образом, терапия с помощью EhoDox снижает лекарственную устойчивость, что может привести к ингибированию метастазирования с минимальными побочными эффектами. Дальнейшие исследования будут посвящены анализу использования экзосом молока с другими цитостатическими препаратами. *Работа поддержана грантом РФФ 18-74-10055 (рук. С.Е. Седых).*

ИНГИБИТОРЫ GСPII ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ПРОСТАТЫ И ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

Р.Р.Шафиков^{1,2}, А.Е. Мачулкин^{1,3}, А.А. Успенская¹, Д.А. Скворцов¹, О.А. Донцова^{1,2}

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;

³Российский университет дружбы народов, Москва

Глутаматкарбоксипептидаза II (Glutamate carboxy peptidase II, GСPII) является признанным маркером рака предстательной железы, привлечшим значительное внимание в качестве мишени для визуализации GСPII-содержащих опухолей и доставки лекарств на основе низкомолекулярных лигандов GСPII. Модульный подход к разработке ингибиторов GСPII позволил нам продемонстрировать взаимосвязь структуры и активности между различными модификациями и биологическими свойствами ингибитора. Наша серия ингибиторов основана на GСPII-связывающем мотиве глутамат-мочевина-лизин с линкером для присоединения флуоресцентного красителя или иных молекул. Совместно с коллегами с химического факультета МГУ мы показали, что введение модифицированных ароматических аминокислот в линкер оптимальной длины (около 20Å) и ε-NH₂ положение Lys ингибитора GСPII позволяет усилить ингибирующие свойства молекул, достигая значений K_i менее 1 нМ. Мы продемонстрировали отсутствие токсичности в отношении клеточных линий различного происхождения вплоть до концентрации 100 мкМ для наиболее сильных ингибиторов. Наиболее сильные и нетоксичные из них были конъюгированы с флуоресцентными красителями и противоопухолевыми препаратами нашими коллегами. Для SulfoCy5-содержащих конъюгатов была показана специфичность в отношении GСPII-экспрессирующих клеточных линий LNCaP и 22Rv1 по сравнению с отсутствием связывания на поверхности GСPII-отрицательных РС-3. Конъюгация ингибитора GСPII с монометил ауристатином E привела к изменению токсичности с GСPII-независимой на GСPII-специфическую. Полученные ингибиторы с разнообразной структурой имеют широкий потенциал для дальнейших прикладных исследований, в том числе получен патент на их флуоресцентные производные. *Исследование выполнено при поддержке РФФИ 20-34-90150.*

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА АНАЛИЗА КРИВЫХ ПЛАВЛЕНИЯ PCR-NRM

И.Д. Щечкин^{1,2}, Д.С. Кузнецова^{1,2}

¹НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий, Приволжский исследовательский медицинский университет; ²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет

им. Н.И. Лобачевского

На данный момент молекулярная диагностика является одним из основных этапов лечения онкологических пациентов. Анализ индивидуальных молекулярно-генетических характеристик опухолей стал основой для разработки таргетных препаратов, воздействующих на конкретные молекулярные мишени злокачественных клеток. Одним из наиболее распространенных методов анализа является ПЦР с плавлением в высоком разрешении (PCR-NRM). Данный подход стал особенно актуален в период пандемии, и на данную тему было опубликовано более 2000 работ за 2021 год. Однако, до сих пор сохраняется проблема влияния человеческого фактора на результат выявления мутантных аллелей на основе кривых плавления. Таким образом, с целью повышения точности проводимого молекулярного анализа необходима разработка новых методов автоматического выявления мутантных аллелей и аллелей дикого типа.

Цель работы: Создание алгоритма обработки кривых плавления PCR-NRM, который будет способен с высокой точностью выявлять опухоли с соматическими мутациями.

Методом PCR-NRM были проанализированы образцы опухолей различных локализаций (колоректальный рак, рак легких и др.), полученные из парафиновых блоков, образцов крови и ткани опухоли. Каждый отдельный ПЦР тест с последующим плавлением представлял собой отдельный эксперимент с проведенной обработкой результатов. Для одного эксперимента выборка составляла 6-11 образцов, которые были исследованы на наличие 6-8 наиболее распространенных соматических мутаций в генах BRAF, KRAS, NRAS.

Были получены кривые плавления и кривые производной плавления для каждого образца и каждого гена (BRAF, KRAS, NRAS). Далее для каждой кривой плавления с мутантным аллелем были рассчитаны полиномиальные уравнения от 3 до 7 порядка, описывающие кривые плавления на разных участках полученных кривых, начиная из самых значимых в центре с последующим увеличением области интереса до краев кривых (не более 10). Полученные коэффициенты, описывающие кривые, использовались для кластеризации образцов при помощи метода k-ближайших соседей, который при заявленных ранее повторностях (до 50 для одного образца) при усреднении показывал вероятность того, что образец относится к тому или иному классу. Полученные вероятности округлялись по заданному порогу, а соответствующие такому варианту результаты кластеризации использовались снова при построении иерархических дендрограмм, которые подтверждали результаты. При последующей аллель специфической ПЦР или при секвенировании данные о наличии или отсутствии мутации валидировались.

Таким образом, был разработан алгоритм анализа кривых плавления, который способен разделять мутантные аллели и аллели дикого типа при проведении PCR-NRM, что позволит решить проблему человеческого фактора, возникающего при определении соматических мутаций, и ускорить процесс обработки кривых плавления. *Работа выполнена при поддержке программы стратегического академического лидерства Приоритет 2030.*

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЕРВИЧНОЙ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ НЕЙРОНОВ В УСЛОВИЯХ АКТИВАЦИИ ЭЛЕМЕНТОВ ПУРИНЕРГИЧЕСКОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ *IN VITRO*

А.С. Зеленцова¹, А.Ю. Борисова¹, В.С. Беляева¹, П.А. Тагунов², А.И. Долгих², А.В. Дейкин¹, М.Ю. Скоркина¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород; ²Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, Орел

Пуринергическая сигнальная система выступает центральным пусковым звеном в развитии митохондриальной дисфункции, сопровождающей нейродегенеративные заболевания. Целью работы явилось оценить метаболический потенциал первичной смешанной культуры нейронов среднего мозга мышей линии CD1 путем измерения скорости митохондриального дыхания в условиях активации элементов пуринергической сигнальной системы добавлением экзогенного АТФ.

Первичную смешанную культуру нейронов получали от новорожденных однодневных детенышей мышей CD1. После декапитации животных ткань мозга помещали в охлажденный раствор Версена, выделяли средний мозг, который трипсицировали 20 мин при 370С, ресуспендировали в 2 мл нейробазальной среды, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, добавку В-27 2%, 0,5 мМ Glutamax. Проводили подсчет клеток в камере Горяева, после чего клетки высаживали в планшеты Cell Culture Miniplate (Seahorse, USA) из расчета 40 тыс. клеток на 1 лунку. Культивирование клеток осуществляли в течение 7 дней. В эксперименте использован 10 мМ аденозин-5-трифосфат динатриевая соль тригидрат, который вводили в объеме 22 мкл в порт А сенсорного картриджа анализатора метаболизма, в качестве контроля был планшет без добавления АТФ. Оценку метаболического потенциала нейронов проводили на 7 день культивирования первичной смешанной культуры нейронов. Измерения выполнены с использованием анализатора клеточного метаболизма Seahorse Bioscience XFp (Seahorse Bioscience, Agilent, USA), используя kit Mitostress test. В результате под влиянием АТФ скорость утечки протонов из митохондрии возросла в 2 раза, максимальное дыхание - в 1,5 раза, запасная дыхательная способность увеличилась на 65%. Полученные результаты указывают на усиление окислительной способности митохондрий за счет усиления работы комплекса I электрон транспортной цепи, в результате чего стимулируется окислительное фосфорилирование. Исследования подобного рода могут быть полезны при поиске новых терапевтических мишеней с участием пуринергических сигнальных путей в сложном лечении нейродегенеративных заболеваний, вызванных митохондриальной дисфункцией.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2021-1346.

РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТЫ РЕГУЛЯЦИИ РЕДОКС-ГОМЕОСТАЗА, В РИСКЕ РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

О.Ю. Бушуева

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) занимает лидирующее место в структуре причин смерти во всем мире. Несмотря на многочисленные доказательства значимой роли окислительного стресса в развитии ИБС, исследования сайт-специфического метилирования ДНК генов, участвующих в регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза сосудов, единичны. Целью данной работы стал анализ связи уровней метилирования ДНК генов, кодирующих ферменты-регуляторы редокс-гомеостаза, с риском развития ИБС.

Проведен анализ паттернов метилирования ДНК в промоторных или регуляторных областях 4 генов (*GCLM*, *GSTP1*, *TXNRD1* и *MPO*) в лейкоцитах периферической крови 45 пациентов с ИБС и 83 здоровых лиц соответствующего пола и возраста. Бисульфитную модификацию ДНК проводили с использованием коммерческого набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США). Степень метилирования оценивали методом пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24 (Qiagen). Все статистические анализы проводились с использованием программной среды R. Для описания данных использовались медиана (Me), 25-й перцентиль (Q1) и 75-й перцентиль (Q3). Для сравнения уровня метилирования CpG-сайтов использовали U-критерий Манна-Уитни.

Уровни метилирования всех исследованных генов, за исключением *MPO*, варьировали в низких пределах (менее 10% метилированных цитозинов). Зарегистрированы статистически значимо более низкие уровни метилирования в CpG-сайте (chr1:94374293, GRCh37 [hg19]) гена *GCLM* у пациентов с ИБС по сравнению с контрольной группой (больные ИБС: Me=6,1% [Q1=4,8%; Q3=7,6%]; контроль: Me=14,5% [Q1=10,4%; Q3=21,7%], $p=1,49 \times 10^{-11}$). Наиболее выраженные различия между больными и контролем выявлены при анализе метилирования гена миелопероксидазы. В лейкоцитах больных ИБС уровень метилирования CpG-сайтов в анализируемом районе *MPO* (chr17:56356470, GRCh3 [hg19]) в среднем был достоверно ниже (Me=26,5% [Q1=24,5%; Q3=32,3%]), чем в контрольной группе (Me=35,4%; [Q1=30,3%; Q3=42,6%], $p=3,83 \times 10^{-7}$).

Таким образом, гипометилирование CpG-сайтов гена *MPO* в лейкоцитах периферической крови представляется прогностически значимым эпигенетическим маркером ишемической болезни сердца. Требуется дальнейшие эпигенетические исследования генов, связанных с окислительным стрессом, при ишемической болезни сердца.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ВАРИАНТ RS4644832 *SERF2* АССОЦИИРОВАН С ПОВЫШЕННЫМ РИСКОМ РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

О.Ю. Бушуева¹, И.В. Шиленок¹, Т.А. Стецкая¹, К.А. Кобзева¹, М.О. Солдатова¹, Д.Е. Гуртовой¹, В.О. Солдатов², А.В. Дейкин²

¹Курский государственный медицинский университет, Курск; ²Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

Протеотоксический стресс, связанный с накоплением структурных белков, является важнейшим молекулярным механизмом ишемического и реперфузионного повреждения головного мозга в остром периоде ишемического инсульта (ИИ). Молекулярные шапероны осуществляют широкий спектр реакций процессинга клеточных белков, предотвращают их агре-

гацию, восстанавливают третичную и четвертичную структуру поврежденных белков. Целью данного исследования стал анализ ассоциации SNP rs4644832 в гене *SERF2*, кодирующем шаперон семейства Hsp90, с риском развития ИИ.

В исследовании были включены 1929 неродственных русских индивидов (861 больных ИИ и 1068 здоровых добровольцев) популяции Центральной России. Исследование было одобрено Региональным этическим комитетом. Генотипирование было выполнено методом ПЦР в режиме «реального времени» с дискриминацией аллелей с помощью Taq-Map зондов. Для анализа ассоциаций генотипов с риском развития ИИ пользовались программой SNPStats, доступной онлайн (<https://www.snptest.net/start.htm>). Ресурс GTExportal (<http://www.gtexportal.org/>) был применен для анализа связывания SNP с локусами количественных признаков экспрессии (eQTL).

Обнаружена ассоциация rs4644832 *SERF2* с повышенным риском развития ИИ (рисковый аллель G; кодоминантная модель ассоциаций: OR=1.35, 95% CI=1.10–1.67, P=0.006; доминантная модель ассоциаций: OR=1.29, 95% CI=1.05–1.58, P=0.016). Последующий анализ ассоциаций в зависимости от пола выявил, что данный генетический вариант связан с развитием ИИ исключительно у женщин (рисковый аллель G; кодоминантная модель ассоциаций: OR=1.49, 95% CI=1.13–1.97, P=0.016; доминантная модель ассоциаций: OR=1.43, 95% CI=1.09–1.88, P=0.009; аддитивная модель ассоциаций: OR=1.29, 95% CI=1.02–1.64, P=0.035). Согласно данным GTEx Portal, протективный аллель A rs4644832 повышает экспрессию гена *SERF2* в цельной крови (P=1,1×10⁻⁸), аорте (P=3,3×10⁻⁷), артериях (P=7,9×10⁻⁶).

В данной работе впервые в мире установлена ассоциация rs4644832 в гене *SERF2*, кодирующем шаперон семейства Hsp90, с повышенным риском развития ишемического инсульта и установлены пол-специфические эффекты в проявлении ассоциации.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00288, <https://rscf.ru/project/22-15-00288>.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ МЫШИНЫХ МОДЕЛЕЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: ОТ ПАЦИЕНТА К ТЕСТ-СИСТЕМЕ И ОБРАТНО.

М.В. Корокин, М.В. Покровский, В.О. Солдатов, А.М. Краюшкина, Н.С. Жунусов, Э.И. Таран, Л.В. Корокина, И.С. Коклин, А.В. Дейкин, В.Л. Бухман

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

Одной из классических проблем при поиске и доклиническом изучении новых препаратов является низкая транскрибируемость результатов в клиническую практику. По разным оценкам, менее 10% препаратов, протестированных на эффективность в доклинических испытаниях, проявляют активность при лечении реальных пациентов. В этой связи одной из наиболее важных потребностей биомедицинских центров, связанных с доклиническими испытаниями, являются репрезентативные «пациентоподобные» животные модели человеческих заболеваний. Основным инструментом к созданию таких моделей являются технологии генетического редактирования. При этом для воспроизведения молекулярного фенотипа, связанного с заболеванием у человека, изначально необходимо определить ключевые или «причинные» гены, мутации в которых запускают патологический процесс. В зависимости от функции гена и эффекта мутации, заболевание может быть следствием потери («loss-of-function») или изменения/усиления (gain-of-function) функции белка. Это обстоятельство является очень важным при определении стратегии создания мутантной тест-системы. Например, наиболее часто встречающийся тип причинных для нейродегенеративных заболеваний мутаций «gain-of-function» зачастую позволяет воспроизвести патологический фенотип за счет случайного встраивания мутантной копии (или мультископии) человеческого гена в геном тест-системы без редактирования гомологичного гена животного. Напротив, loss-of-function мутации требуют изменения последовательности собственного гена модели, либо за счет полного нокаута, либо путем прецизионного изменения нуклеотидной последовательности.

В настоящее время нашим коллективом реализуется подход к созданию мышиной модели болезни Паркинсона. С использованием системы CRISPR/Cas9 патологические человеческие мутации были воспроизведены в мышином гене *Snca*, кодирующем белок синуклеин альфа. Кроме того, часть гена *Snca* была фланкирована LoxP-сайтами и мыши были скрещены с тамоксифен-индуцируемыми активаторами с тканеспецифичной экспрессией Cre-рекомбиназы в дофаминергических нейронах. Таким образом, данная система позволяет изучать эффект гуманизированного гена *Snca* и его прижизненно-индуцированной тканеспецифичной инактивации.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2021-1346.

НАРУШЕННЫЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ФЕНОТИП У ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МЫШЕЙ С МУТАЦИЕЙ Del8Val ГЕНА *Hprt1*: ФОКУС НА НЕЙРОНАЛЬНЫХ АНОМАЛИЯХ

М.Ю. Скоркина¹, А.Ю. Винокуров², А.В. Дейкин¹, А.С. Зеленцова¹, М.О. Солдатов³, А.Ю. Борисова¹, В.С. Беляева¹, М.В. Покровский¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород; ²Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, Орел; ³Курский государственный медицинский университет, Курск

В нормальных условиях большая часть пуринов образуется в результате рециркуляции продуктов пуринового обмена и не синтеза *de novo*. Биохимический каскад «спасения» пуринов реализуется за счет работы сложной ферментативной архитектуры, ключевую роль в которой играет фермент гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (HGprt). Мутации в гене *HPRT1*, кодирующем данный фермент, являются причиной развития синдрома Леша-Нихана, X-сцепленного заболевания, проявляющегося гиперурикемией и мультисистемными нарушениями с тяжелым неврологическим фенотипом. При этом несмотря на то, что основные биохимические аспекты заболевания расшифрованы, механизмы развития неврологических аномалий остаются невыясненными. В данной работе представлены результаты оценки биоэнергетической функции первичной нейроглиальной культуры мышей, несущих человекоподобную мутацию Del8Val в гене *Hprt1*.

Мыши с делецией TCG в первом экзоне (Hprt1del8Val), служащие моделью LNS были получены в Институте биологии гена РАН. Уровень мочевой кислоты в крови мутантных мышей определяли уриказно-пероксидазным методом с колориметрическим определением. Первичную смешанную культуру среднего мозга получали от новорожденных однодневных детенышей. Культивирование клеток осуществляли в течение 11 дней. Оценку метаболического фенотипа клеток проводили на 12 день культивирования первичной смешанной культуры нейронов. Измерения выполнены с использованием анализатора клеточного метаболизма Seahorse Bioscience XFp (Seahorse Bioscience, Agilent, USA), используя kit Mitostress test.

Было обнаружено, что взрослые мыши демонстрируют 1,3-кратное повышение уровня мочевой кислоты в сыворотке крови. В результате анализа первичных культур среднего мозга были выявлены митохондриальные аномалии, свидетельствующие об ингибировании комплекса I митохондриальной цепи переноса электронов. Полученные результаты согласуются с предыдущими данными, согласно которым в экспериментах, выполненных на гемопоэтических стволовых клетках пациентов с синдромом Леша-Нихана, показано снижение мембранного потенциала митохондрий, повышенный уровень супероксида, тенденция к повышению концентрации АТФ.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2021-1346.

ПЕПТИДНЫЙ МИМЕТИК ГЕТЕРОРЕЦЕПТОРА ЭРИТРОПОЭТИНА rHBSP УЛУЧШАЕТ ФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

В.О. Солдатов¹, А.Ю. Винокуров², П.А. Уколова², Ю.В. Степенко¹, В.С. Беляева¹, Э.И. Таран¹, И.С. Кочкарова¹, В.М. Покровский¹, А.М. Краюшкина, Н.С. Жунусов, О.А. Пученкова¹, А.В. Дейкин¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород; ²Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, Орел

Стимуляция эритропоэтинового рецептора EPOR/CD131 является одним из механизмов неспецифической нейропротекции при ряде патологических состояний. Целью исследования являлось проведение комплексной оценки позитивных эффектов стимуляции EPOR/CD131 при моделировании нейродегенеративных процессов *in vivo* и *in vitro*. В качестве миметиков EPOR/CD131 были использованы rHBSP и препарат сравнения эритропоэтин (EPO) в дозах 5 и 10 мкг/кг, соответственно, для исследований *in vivo*, а также в концентрациях 100 и 500 нМ для исследований *in vitro*.

В модели этанол-индуцированной нейродегенерации у крыс rHBSP снизил проявления когнитивного дефицита и тревожности, а также нейроморфологические нарушения, вызванные 90-дневным вынужденным потреблением раствора этанола в возрастающих концентрациях. В модели ротенон-индуцированной ретинопатии однократная инъекция 10 мкг/кг EPO или 5 мкг/кг rHBSP привела к значительному снижению дегенерации ганглионарных клеток сетчатки и нормализации экспрессии молекулярных маркеров ретинопатии. В то же время используемая доза пептида не привела к статистически значимому сдвигу жестких конечных точек в мышинной модели бокового амиотрофического склероза, вызванной экспрессией аберрантного трансгена *FUS[1-359]*. Примечательно, что в моделях алкогольной и ротеноновой токсичности применение агонистов EPOR/CD131 сопровождалось увеличением экспрессии мРНК генов, связанных с ауто- и митофагией, что свидетельствует о запуске элиминации поврежденных митохондрий и белков как потенциальном компоненте нейропротективного действия.

В исследованиях *in vitro* было установлено, что инкубация в 500 нМ растворах EPO и rHBSP резко увеличила выживаемость первичной мышинной нейроглиальной культуры, обработанной блокатором комплекса I ротеноном. Кроме того, инкубация с rHBSP значительно улучшила метаболический фенотип и митохондриально-лизосомальную колокализацию.

Таким образом, фармакологическая стимуляция EPOR/CD131 является перспективной стратегией коррекции нейродегенеративных повреждений. При этом одним из значимых механизмов реализации нейропротекции является улучшение митохондриальной функции. *Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2021-1346.*

МЕХАНИЗМЫ ПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ДИХЛОРАЦЕТАТА НАТРИЯ ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОМ СИНДРОМЕ

К.А. Попов, И.М. Быков, А.Н. Столярова, Я.Е. Денисова, А.А. Гончарова, А.С. Владимиров

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

Перспективные направления коррекции ишемически-реперфузионных повреждений (ИРП) разных органов и тканей связаны с воздействием на энергетический обмен. В условии ИРП снижается активность пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК), что создает ограничение для использования глюкозы после восстановления кровотока. Активность ПДК можно увеличить путем введения ингибитора киназы пируватдегидрогеназы (ПДГ) – дихлорацетата натрия (ДХА). При этом сама киназа, фосфорилируя ПДГ инактивирует мультиферментный комплекс. Имеются данные об эффективности снижения уровня лактата, восстановления уровня АТФ и креатинфосфата в головном мозге и нейропротективном эффекте ДХА в условиях церебральной ишемии у разных лабораторных животных. На фоне введения ДХА снижается выраженность окислительного стресса, активация микроглии, нарушение гематоэнцефалического барьера и даже гибель нейронов при ишемии, вызванной гипогликемией. В нашей лаборатории показана возможность метаболической профилактики ИРП печени путем введения ДХА в дозировке 300 мг/кг внутривенно. В этих условиях показано не только снижение уровня лактата, но и более низкие уровни активности ЛДГ, АСТ и АЛТ в плазме крови. Механизм противоишемического действия ДХА может быть связан с несколькими факторами – снижением уровня лактатацидоза и реактивация ПДК в реперфузионный период. Другим нашим предположением является имитация ишемического прекодиционирования, опосредованная интенсификацией образования активных форм кислорода (АФК), в ишемический период на фоне гипервосстановленности компонентов дыхательной цепи митохондрий и гипоксии. Это предположение также подтверждается усилением образования продуктов окислительных модификаций в ишемизированной ткани на фоне введения ДХА. АФК рассматриваются в качестве одних из сигнальных час-

тиц, реализующих протективное действие преколонизации. Таким образом, может быть несколько дополнительных стратегий профилактики ИРП, связанных с регуляцией активности ПДК и интенсификацией процессов прооксидантной направленности. *Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № Н-21.1/31/21.*

ТЕРМОГЕНЕТИКА КАК НОВЫЙ МЕТОД КОНТРОЛЯ АКТИВНОСТИ В-КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.А. Можяев^{1,2,3}, С.С. Сабинин¹, А.А. Ланин⁴, И.В. Кельмансон^{1,2}, Е.С. Фетисова^{1,2}, Д.Джеппи⁵, А.В. Розов⁵, В.С. Овечкина^{1,2}, А.В. Балацкий⁵, А.М. Желтиков⁶, В.В. Белоусов^{1,2,5}

Институт биоорганической химии им. М.М. Шенякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; ³ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН; ⁴МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет; ⁵Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва; ⁶Texas A&M University

Термогенетика представляет собой подход для регуляции активности клеток с помощью термоактивируемых каналов семейства TRP, применимый как для модельных клеточных культур, так и для животных *in vivo*. TRP являются неселективными катионными каналами, способными при активации пропускать ионы Ca^{2+} и Na^+ . Ca^{2+} является вторичным мессенджером в регуляции метаболизма клеток. Применение TRP каналов, позволяющих управлять внутриклеточной концентрацией Ca^{2+} , является перспективным подходом для контроля активности клеток. β -клетки - одна из разновидностей клеток эндокринной части поджелудочной железы, продуцирующих гормон инсулин, который понижает уровень глюкозы крови. Их активация регулируется деполяризацией мембраны с последующим входом Ca^{2+} в цитоплазму, поэтому TRP каналы являются подходящим синтетическим активатором секреции инсулина. Наличие инструмента управления активностью β -клеток и изучение механизмов их работы имеет важнейшее значение для лечения сахарного диабета. Учитывая долговременное развитие заболевания, лучшим подходом к его лечению является сохранение и регуляция секреции инсулина собственными β -клетками пациента. На первом этапе мы провели поиск термочувствительного канала из семейства TRP человека. Среди имеющейся линейки наиболее перспективным по пороговой температуре активации и пропускной способности оказался TRPV1 человека (hTRPV1). Для тестирования генетических конструкций с hTRPV1 под промотором INS2 были использованы клетки инсулиномы мыши MIN6. С помощью метода пэтч-кламп и нагрева клеток инфракрасным лазером нами была зафиксирована деполяризация клеточной мембраны клеток, экспрессирующих hTRPV1. На следующем этапе мы провели эксперименты на островках Лангерганса как более приближенной к реальным условиям модели клеток, секретирующих инсулин *in vitro*. В ходе подбора условий термогенетического управления β -клетками с использованием ПЦР-машины нами удалось увеличить секрецию инсулина островками Лангерганса как минимум в 1,8 раза. Для доставки генетических конструкций в β -клетки нами был получен вектор на основе аденоассоциированного вируса, наиболее эффективным оказался серотип PHP.S. В результате нами удалось разработать новый метод термогенетической активации hTRPV1 в β -клетках поджелудочной железы, позволяющий управлять секрецией инсулина.

ГИДРОЛИЗ ОЛИГОПЕПТИДОВ S-БЕЛКА SARS-CoV-2 АНТИТЕЛАМИ ПЕРЕБОЛЕВШИХ И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ДОНОРОВ

А.М. Тимофеева, Е.И. Одегова, С.Е. Седых, Г.А. Невинский

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

Знание антигенов и эпитопов, и механизмов их взаимодействия с антителами, имеет важное значение для понимания ответов иммунной системы на патогены и иммунопатогенеза инфекционных заболеваний. Каталитическая активность антител является одним из наиболее распространенных примеров неканонической функции антител. Описаны природные антитела, способные расщеплять нуклеиновые кислоты, белки и полисахариды, а также олигопептиды. Целью данной работы было исследование гидролиза девяти олигопептидов, являющихся узнаваемыми эпитопами SARS-CoV-2 антителами доноров переболевших COVID-19 и/или вакцинированных Sputnik V. Последовательными аффинными хроматографиями из плазмы крови доноров, переболевших COVID-19 и/или вакцинированных Sputnik V, выделены IgG, обладающие сродством к RBD, и к остальной части S-белка (RBD-IgG и S*-IgG, соответственно). В качестве контролей использовали антитела доноров не имеющих антител к SARS-CoV-2. Относительную протеолитическую активность IgG определяли по эффективности расщепления антителами 18-мерных ОП, меченных FITC, соответствующих узнаваемым эпитомам S-белка SARS-CoV-2. Обнаружено, что 6 из 9 олигопептидов эффективно гидролизировались RBD-IgG и S*-IgG, но не антителами контрольной группы. Проведен биохимический анализ обнаруженных каталитических активностей. Показано, что некоторые фракции антител проявляли четко выраженный максимум активности при pH 6,5–7,0. Ингибиторный анализ показал гетерогенность антител: активные центры были подобны сериновым, тирозиновым протеазам, металлопротеазам и сочетанием различных типов активностей. У всех антител с активным центром, подобным металлопротеазам, активность гидролиза олигопептидов значительно увеличивалась при добавлении 2 мМ Ca^{2+} . Таким образом, в данной работе впервые показано, что только фракции RBD-IgG и S-IgG способны гидролизовать олигопептиды соответствующие узнаваемым эпитомам S-белка, но не другие фракции IgG. RBD-IgG и S-IgG переболевших COVID-19 и/или вакцинированных Sputnik V, оказались активны в гидролизе шести из девяти олигопептидов, соответствующих эпитомам S-белка. Показана каталитическая гетерогенность фракций RBD-IgG и S-IgG выделенных из разных групп доноров в гидролизе олигопептидов одного белка. *Исследование поддержано грантом РФФИ 21-75-10105 (рук. А.М. Тимофеева).*

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА SARS-CoV-2 ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G И M К КОРОНАВИРУСУ SARS-CoV-2 В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

А.М. Ромозанова, А.Р. Ибрагимова, Н.Н. Хабилова, Р.Р. Хадиуллина, А.Р. Рахматуллина, Р.Р. Мифтахова, А.А. Ризванов, Р.Ф. Хайруллин

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Определение иммунного статуса и эффективности вакцинации населения является важной задачей в условиях пандемии вирусной инфекции SARS-CoV-2. Для определения наличия и уровня антител широко используются иммуноферментный (ИФА) и иммунохроматографический (ИХА) анализы. Использование нуклеокапсидного (N) белка в качестве антигена в сочетании с белком шипа (S) или его фрагментом – RBD доменом позволяет дифференцировать иммунный ответ, полученный после вакцинации от естественно полученного после перенесенной инфекции. Нами была разработана рекомбинантная плаزمиды рЕТ-His-CovN, содержащая ген, кодирующий фрагмент N белка SARS-CoV-2 слитый с полигистидиновым тэгом. Была оптимизирована методика экспрессии, выделения и очистки химерного N белка. Для выбора оптимального продуцента транзистентная экспрессия рекомбинантного N белка проводилась в культуре клеток экспрессионных штаммов *E. coli* семейства BL21(DE3): Rosetta, pLysS и RIL с различными условиями индукции. Наибольший выход белкового продукта наблюдался в случае экспрессии в штамме *E. coli* BL21(DE3)RIL при культивировании в аутоиндукционной среде, содержащей лактозу в качестве индуктора. Были проведены сравнительные эксперименты по очистке рекомбинантного белка с металлохелатными сорбентами заряженными ионами разных переходных металлов – Cu (II), Ni (II), Zn (II), Co (II). Наиболее однородный образец с максимальным выходом рекомбинантного N белка был получен в результате очистки на Cu-NTA сефарозе. Подобранные условия экспрессии и очистки позволяют получить рекомбинантный нуклеокапсидный белок SARS-CoV-2 пригодный для использования в качестве антигена для выявления антител к коронавирусу SARS-CoV-2. С использованием полученного рекомбинантного антигена были получены лабораторные образцы диагностических наборов для детекции иммуноглобулинов класса G и M к вирусу SARS-CoV-2 методами иммуноферментного и иммунохроматографического анализа в сыворотке/плазме человека. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ВЕГЕТАТИВНЫХ И ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА *IN VITRO* И ВНУТРИ МАКРОФАГОВ В ПРИСУТСТВИИ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ.

М.О. Шлеева¹, И.А. Линге², И.А. Глигонов¹, Г.Н. Вострокнурова¹, А.С. Апт², А.С. Капрельянц¹, А.П. Савицкий¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ²Лаборатория иммуногенетики, ЦНИИ туберкулеза РАН, Москва

Проблемой эффективного лечения туберкулеза в клинике является распространённость антибиотикорезистентных штаммов возбудителя *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Около четверти населения земного шара латентно инфицированы, что обусловлено переходом Mtb в состояние покоя. Известные противотуберкулезные препараты, применяемые в медицинской практике, не активны в отношении покоящихся Mtb. Антимикробная фотодинамическая инактивация (аФДИ) является одной из альтернатив антибиотикотерапии, способной инактивировать бактерии, в том числе с широкой и множественной лекарственной устойчивостью. Наиболее перспективным является использование эндогенных фотосенсибилизаторов, в частности порфиринов. Целью данной работы являлось изучение способов стимуляции накопления эндогенных порфиринов в клетках возбудителя туберкулеза и оценка возможности фотоинактивации вегетативных и покоящихся форм Mtb. Покоящиеся формы Mtb содержали в 6 раз больше порфиринов по сравнению с вегетативными клетками. В присутствии в среде роста 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) наблюдалось увеличение количества порфиринов в покоящихся клетках Mtb в 85 раз. В покоящихся формах Mtb было выявлено необычное производное копропорфина - тетраметилловый эфир копропорфина (СРМе4). В присутствии АЛК в покоящихся клетках Mtb увеличивается концентрация уропорфина, копропорфина и, особенно, СРМе4. Присутствие Mg^{2+} и Zn^{2+} вызывало дополнительное увеличение накопления порфирина, что связано со стимуляцией порфириногенсинтазы. Анализ транскриптома выявил повышение активности ряда генов при росте клеток в присутствии АЛК, связанное с путями синтеза и метаболизма порфиринов и прекорринов. Микобактерии, выращенные в присутствии АЛК, демонстрировали очень высокую фоточувствительность (около 99,99% бактерий погибало) как *in vitro*, так и в макрофагах. При этом первичным эффектом светового воздействия было резкое снижение активности ДФИ-редуктазы бактерий, вплоть до нулевого значения. Впервые продемонстрировано успешное применение аФДИ для инактивации клеток Mtb *in vitro* и в макрофагах, что обусловлено значительным накоплением эндогенных порфиринов в присутствии АЛК. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-15-00324

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИМИДЖИНГ

ВЛИЯНИЕ ДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФОТОПЕРЕКЛЮЧАЕМЫХ И ФОТОКОНВЕРТИРУЕМЫХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА SAASOTI НА ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

М.Г. Хренова^{1,2}, А.В. Гавшина², И.Д. Сольвьев², Н.К. Марынич², А.П. Савицкий^{1,2}

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, ²ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва

Белки семейства SAASoti имеют структуру β -бочонка и автокаталитически формирующийся хромофор, являясь аналогами хорошо известного зеленого флуоресцентного белка (GFP) с гораздо более разнообразными фотохимическими и фотофизическими свойствами. Исходно находясь в зеленой форме (с полосой флуоресценции в зеленой области видимой части спектра), хромофор может обратимо фотопереклюаться в темное состояние в результате цис-транс фотоизомеризации. Также, при воздействии синим светом возможно необратимое окисление хромофора, приводящее к удлинению сопряженной π -системы и смещению полос поглощения и флуоресценции в более длинноволновую область. Так формируется красная форма. Расширение набора белков этого семейства за счет введения точечных аминокислотных замен привело к появлению флуоресцентных белков, в которых фотоизомеризация (фотопереклечение) может проходить и в красной форме. Появление большого набора новых экспериментальных данных дало возможность предложить рациональные объяснения наблюдаемым свойствам с привлечением современных методов молекулярного моделирования. В работе представлены результаты расчетов, выполненных методами молекулярной динамики с классическими потенциалами и потенциалами комбинированного метода квантовой / механики молекулярной механики (КМ/ММ). В результате расчетов определены аминокислотные остатки, динамическое поведение которых влияет на конформационную подвижность хромофора и, как следствие, восстановленные флуоресцентного состояния в результате термической релаксации из темного состояния в ходе изомеризации. Также проведен динамический сетевой анализ, позволяющий разделить систему на сообщества, движение внутри которых скоррелировано. Оказалось, что для всех представителей как в красной, так и в зеленой форме возможна изомеризация, если движения фенильного фрагмента хромофора скрепелированы с движениями аминокислотного остатка гистидина, следующего за хромофором. Важно отметить, что это наблюдается как для красной, так и для зеленой формы. При этом в красной форме этот остаток участвует в сопряженной π -системе хромофора. Также в результате анализа динамического поведения хромофора при описании методами КМ/ММ возможно проанализировать динамическое поведение связи C – O фенильного фрагмента хромофора, что определяет рКа этой группы.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ПО БИМОДАЛЬНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ *IN VIVO* СЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ dCas9 И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЦВЕТНЫХ БЕЛКОВ

Л. Малашенок^{1,2}, Г. Абушинова^{1,2}, Н. Казачкина¹, А. Богданов мл.³, В. Жердева¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Институт генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва; ³Медицинская школа UMASS Чан, отделение радиологии, Вустер, Массачусетс, США

Каталитически неактивный Cas9 (dCas9) имеет множество применений, наиболее полезным из которых является активация/репрессия транскрипции. Также на основе dCas9 разработано множество технологий меченая хроматина в клетках.

В нашей работе мы предлагаем подход для Cas9-опосредованной визуализации генома *in vivo* с использованием сочетанных методов флуоресцентного имиджинга и МРТ.

С помощью лентивирусной трансфекции были получены клоны опухолевых клеток аденокарциномы легкого A549, экспрессирующие химерные белки – двойные ортологи StdCas9 и Nmdcas9, меченные флуоресцентными белками EGFP и mCherry соответственно. Для регулируемой экспрессии химерных белков был выбран доксициклин-зависимый промотер Tet-on. Опухолевые ксенографты на основе полученного клона были стабилизированы в мышцах линии nude. Экспрессию ортологов в подкожных опухолях индуцировали путем введения доксициклина (Dox) мышам в желудок в течении двух дней в количестве 200 мкг. В результате развивалась слабоинтенсивная флуоресценция (ИФ), которая достигала максимума на 3 дня после индукции доксициклином. Повышение ИФ улучшения контраста добивались путем нанесения оптической просветляющей смеси на основе 70% раствора гадобутрола (ГБ) с добавлением 5% ДМСО. Таким образом, получали флуоресцентные изображения опухолей в на третий день методом планарного имиджинга, а также с использованием флуоресцентного имиджинга с временным разрешением (FLIM). Использование ГБ внутривенно в концентрации 0,15 ммоль/кг позволяло определить степень перфузии опухолевого узла методом магнитно-резонансной томографии в режиме 3D GRE 1T MPT (Aspect Imaging, Шохам, Израиль), а также локализовать изображение флуоресценции ортолога Nmdcas9с реконструированным в программе ImageG/Fiji МР-изображением (n=4). При наложении изображений область флуоресценции индуцибельной экспрессии химеры dCas9-FP опухоли совпала с гиперинтенсивным МР-изображением.

Таким образом, сочетание методов оптического просветления *in vivo* с использованием стандартного клинического контрастного вещества гадобутрола и индуцибельной экспрессии химер dCas9-FP позволило получить высокконтрастные совмещенные изображения в режиме бимодальной визуализации (МРТ и флуоресцентный имиджинг)

Данная работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-14-00205

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ H_2O_2 В НЕЙРОНАХ ПРИ ГИПОКСИИ *IN VITRO* И *IN VIVO* В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

А.Д. Иванова^{1,2}, Д.А. Котова^{1,3}, И.В. Кельмансон^{1,3}, Ю.В. Храмова^{1,2}, А.П. Трифонова⁴, М.А. Судоплатов³, М.С. Почечуев², И.В. Федотов^{2,5,6,7}, А.Б. Федотов^{2,6,7}, А.М. Желтиков^{2,5,6,7}, В.В. Белоусов^{1,3,8,9}, Д.С. Билан^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁴Физтех-школа биологической и медицинской физики, МФТИ, Москва; ⁵Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University, College Station, Texas, США; ⁶Российский квантовый центр, Сколково, Москва; ⁷Казанский квантовый центр, Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева, Казань; ⁸Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва; ⁹Institute for Cardiovascular Physiology, Georg August University Göttingen, Гемтинген, Германия

Известно, что диабет усугубляет течение и последствия ишемического инсульта. Однако, неизвестно, как высокий гипергликемический статус при диабете влияет на биохимические процессы в патогенезе ишемического инсульта. В данной работе с помощью генетически-кодированного биосенсора *HyPer7* нами была исследована динамика концентрации H_2O_2 в митохондриальном матриксе нейронов *in vitro* и *in vivo* в условиях гипергликемии, которая характерна для диабета. Для создания условий гипергликемии *in vitro* смешанную культуру нейронов с экспрессией биосенсора *HyPer7* инкубировали в среде с повышенной концентрацией глюкозы (60 мМ) в течение 5-ти дней, после чего проводили регистрацию сигнала биосенсора в условиях гипоксии/реоксигенации. *In vivo* регистрацию изменений динамики флуоресценции *HyPer7* в нейронах мозга при ишемии/реперфузии проводили с использованием модели окклюзии средней мозговой артерии (МСАО) и методов оптоволоконной регистрации флуоресцентного сигнала. Для этого гены биосенсора *HyPer7* доставляли при помощи вирусных ААV частиц билатерально в хвостатые ядра головного мозга крысам линии SHR за 4 недели до проведения регистрации. Развитие гипергликемического статуса у животных достигали введением стрептозотоцина (STZ, 60 мг/кг). В *in vitro* экспериментах в условиях гипергликемии сигнал биосенсора *HyPer7* нейронах при гипоксии увеличивался и был выше по сравнению с контролем, после чего сигнал постепенно снижался до значений ниже исходных и не восстанавливался при реоксигенации, в отличие от контроля. В *in vivo* экспериментах гипергликемия не влияла на динамику сигнала *HyPer7* в острой фазе и спустя двое суток после инсульта. Однако, в отличие от контроля, у крыс с гипергликемическим статусом после МСАО уровень глюкозы постепенно снижался от > 30 мМ до значений у контрольных животных, размер поврежденной ишемией области был значительно больше, а выживаемость таких животных после ишемии/реперфузии была ниже. Таким образом, в нейронах в *in vitro* гипергликемия приводит к повышению концентрации H_2O_2 при гипоксии, однако *in vivo* таковых различий не наблюдали при ишемии, вероятно за счет взаимодействия нейронов с другими клетками мозга. Высокий гликемический статус не влияет на редокс-параметры при инсульте *in vivo*, однако значительно усугубляет последствия инсульта.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИЭФИРОВ – ТРИБОЭЛЕКТРОГЕНЕРАТОРОВ

В.В. Жердева¹, Н.И. Казачкина¹, В.В. Деева¹, А.А. Богданов²

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва; ²Медицинская школа UMASS Чан, отделение радиологии, Вустер, Массачусетс, США

Биодеградирующие материалы широко используются в медицине. Из них изготавливаются шовный материал – наиболее известное применение, перевязочный материал с антибактериальными свойствами, временные протезы. Широкое развитие получила тканевая инженерия практически всех органов. При исследовании новых полимеров или модификаций уже имеющихся предпочтение отдается полимерам медленно деградирующим полимерам.

Основной идеей работы является создание безбатарейного устройства медицинского применения на основе трибоэлектродгенераторов, в роли которых выступают полиэфир. Трибоэлектричество вырабатывается при деформации полимеров, содержащих перекрестные сшивки. безбатарейное устройство может быть востребовано, например, для дозирования лекарств.

В группе Мартина Тимуска Института физика университета Тарту был синтезирован сополимер полиэфира, содержащий цитрат, гександиол, пропан-1,2-диол и глутарат. В декабре 2021 г. нам были переданы 4 образца, условно обозначенными как П1, П2, П3 и П4. Получение образцов полимеров отличались между собой временем поликонденсации, с помощью которого регулировалось количество перекрестных сшивок [1]. В результате синтеза количество перекрестных сшивок было наименьшим в образце П1 и наибольшим в образце П4.

Задачами данного исследования было оценить биодеградацию переданных образцов в безбелковых и содержащих липазу растворах и цитотоксичность *in vitro* в отношении фибробластных и миобластных клеток мышечной (A9 и C2C12, соответственно).

Было показано, что изучаемых полиэфиров происходит в воде и растворах липазы, причем в присутствии липазы деградация полимеров происходит быстрее. Наименее устойчивым к действию воды и ферментов оказался П1, наиболее устойчивым – П4.

In vitro все изученные образцы обладали низкой цитотоксичностью, однако образцы П3 и П4 были менее токсичными по сравнению с П1 и П2.

Таким образом, образцы полимеров с большим количеством перекрестных сшивок, то есть с более выраженными трибоэлектрическими свойствами, оказались более перспективными для дальнейших исследований по разработке безбатарейного устройства медицинского назначения. Исследование поддержано грантом Министерства науки и образования № 3.2251.21.00 (соглашение № 075-15-2021-942 в электронном бюджете).

ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННО ПРОДУЦИРУЕМОГО ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИНАПСОВ

А.Л. Калиниченко^{1,2,*}, Д. Джаппи^{3,4,*}, Г.М. Солюс^{1*}, Д.И. Мальцев^{1,3}, Ю.А. Богданова^{1,5}, Л.Ф. Мухаметшина^{1,2}, Р.А. Соколов⁵, А.А. Мощенко³, В.А. Шайдунов^{3,6}, А.В. Розов^{3,7,#}, О.В. Подгорный^{1,3,8,#}, В.В. Белоусов^{1,3,8,9,#}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва; ⁴Казанский федеральный университет, Казань; ⁵Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁶Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва; ⁷Институт физиологии и патофизиологии Гейдельбергского университета, Гейдельберг, Германия; ⁸Центр точного редактирования генома и генетических технологий в биомедицине, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁹Институт сердечно-сосудистой физиологии, Геттингенский университет им. Георга Августа, Геттинген, Германия

Окислительный стресс является одним из путей прогрессии нейродегенеративных заболеваний. На сегодняшний день ведется широкомасштабный поиск причин появления и развития этих патологических процессов, но их разнообразие и неоднозначность делает необходимым изучение действия отдельных факторов, таких как активные формы кислорода (АФК), на сложный процесс патогенеза. Было показано, что окислительный стресс участвует в развитии спорадических форм таких заболеваний как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и БАС. Для того чтобы наблюдать и изучать такие процессы изолированно, имеющиеся системы *in vitro* не подходят, поскольку АФК имеют небольшое время жизни и очень реакционноспособные. Моделирование окислительного стресса прямым воздействием АФК на клетки мозга является неэффективной стратегией, поскольку такое воздействие кардинально отличается от процессов окислительного стресса. Поэтому необходимо проводить эксперименты в модельных системах *in vivo*. В ходе данной работы была создана модель изолированного окислительного стресса. Эта система представляет из себя хемотропическую конструкцию на основе дрожжевого фермента оксидазы D-аминокислот (DAAO). Такая система способна контролируемо продуцировать пероксид водорода, который является одним из основных участников окислительного стресса в избранной группе клеток мозга. Используя генетически кодируемый сенсор пероксида водорода HyPer7, мы показали, что в разных системах в нейронах DAAO эффективно синтезирует пероксид водорода только при обработке нейронов D-аминокислотой, что обозначает контролируемость процесса. Электрофизиологические эксперименты на переживающих срезах мозга мыши показали физиологическую значимость синтезируемого пероксида водорода: долговременная потенциация развивалась значительно хуже в синапсах нейронов поля СА1 гиппокампа, трансдуцированных аденоассоциированной вирусной конструкцией, кодирующей DAAO. Мы также получили первичные данные, свидетельствующие о том, что система с DAAO сама не нарушает работу клеток. Результаты этой работы предоставляют уникальный инструмент для моделирования окислительного стресса в мозге и изучения его роли в возникновении нейродегенеративных заболеваний с неизвестной этиологией. Работа выполнена при поддержке грантов РФН 20-15-00280, 22-15-00293.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ИМИДЖИНГ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ АНАЛИЗА РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА И ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ

Д.С. Кузнецова^{1,2}, С.А. Родимова^{1,2}, Н.В. Бобров^{2,3}, А.М. Можеров², В.В. Елагин², М.М. Карabut², И.Д. Щечкин^{1,2}, Д.С. Козлов^{1,2}, Д.П. Крылов^{1,2}, А.И. Гаврина^{1,2}, В.Е. Загайнов^{2,4}, Е.В. Загайнова^{1,2}

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского; ²Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ; ³Приволжский окружной медицинский центр; ⁴Нижегородский областной клинический онкологический диспансер, Нижний Новгород

На сегодняшний день в мировой клинической практике ежегодно регистрируют около 1 млн. новых случаев первичного и вторичного рака печени. До сих пор единственным вариантом лечения пациентов с первичными и вторичными гепатобилиарными злокачественными новообразованиями остается хирургическое лечение печени. Несмотря на современные достижения в хирургической технике и совершенствование методов предоперационной оценки функции печени, в настоящий момент сохраняется высокий риск развития послеоперационной печеночной недостаточности, связанный с различием в уровне регенераторного потенциала печени каждого пациента. Основной идеей исследования является определение новых критериев регенераторного потенциала печени и профилактики синдрома недостаточного размера печени, которые можно было бы оценивать интраоперационно. К настоящему времени мы исследовали метаболический статус гепатоцитов, содержание коллагена в ткани печени лабораторных животных в процессе нормальной регенерации, а также при наличии патологий печени. В исследовании мы использовали комплекс методов метаболического биоимиджинга, который может быть внедрен в клинику, поскольку существует приборная реализация мультифотонной микроскопии для прижизненного исследования органов и тканей пациентов. Важным результатом нашего исследования стало выявление достоверной корреляции параметра процента восстановления печени с вкладом фосфорилированной формы НАДФН до индукции регенерации, а также с увеличением вклада связанной формы НАДФН на ранних сроках восстановления печени. Высокие значения этих параметров можно считать критериями успешной регенерации печени.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №19-15-00263 (метаболический FLIM имиджинг) и гранта Российского научного фонда №22-25-00098 (гистологический анализ печени).

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ИНДИКАТОРА КАЛЬЦИЯ GEM-GECO В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA*

М.В. Кулакова, А.В. Каргинов, М.О. Агафонов

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Кальций является вторичным мессенджером, позволяющим эукариотической клетке отвечать на множество различных воздействий. Для этого в отсутствие воздействий его концентрация в цитозоле ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) поддерживается на низком уровне, чтобы в нужный момент ее резко поднять за счет поступления катионов кальция в цитозоль из внутриклеточных депо или из внешней среды. У дрожжей основным депо кальция является вакуоль, куда эти катионы попадают, в существенной степени, за счет действия кальциевой АТФазы Pmc1. Ранее нами было обнаружено, что у дрожжей рода *Ogataea* инактивация этой АТФазы приводит к фенотипам, связанным с нарушением клеточного цикла. Для дальнейшего изучения этого феномена важно было иметь инструмент для мониторинга изменений $[Ca^{2+}]_{cyt}$ в режиме реального времени. К таким инструментам относятся генетически кодируемые индикаторы кальция, состоящие из циркулярно пермутированного флуоресцентного белка, с одной стороны которого находится кальмодулиновый домен, а с другой – кальмодулин-связывающий пептид. Однако в литературе не было описано примеров использования таких индикаторов для почкующихся дрожжей. Поэтому целью данной работы было определить, можно ли использовать такие индикаторы для мониторинга $[Ca^{2+}]_{cyt}$ у дрожжей *O. parapolymorpha* и как влияет их продукция на физиологию клеток. Для этого был выбран радиометрический сенсор кальция GEM-GECO. Продукция этого белка в клетках мутанта pmc1-Δ *O. parapolymorpha* приводила к сильному снижению скорости роста и усилению фенотипов, вызываемых этой мутацией. В штамме дикого типа продукция GEM-GECO заметно не снижала скорость роста клеток, но приводила к увеличению чувствительности к додецилсульфату натрия, что напоминало фенотипическое проявление мутации pmc1-Δ. Несмотря на выявленные нежелательные физиологические проявления продукции GEM-GECO в клетках *O. parapolymorpha*, мы показали, что этот индикатор может быть использован для мониторинга $[Ca^{2+}]_{cyt}$. В частности, было показано, что при добавлении в среду кальция в высокой концентрации резко возрастает $[Ca^{2+}]_{cyt}$ в течение нескольких минут. В клетках с ненарушенным геном Pmc1 за этим следовало снижение $[Ca^{2+}]_{cyt}$ практически до исходного уровня в течение часа, а у мутанта pmc1-Δ этого не происходило. *Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 20-04-00330).*

МЕТОД МНОГОЦВЕТНОГО ИММУНОГИСТИХИМИЧЕСКОГО ОКРАШИВАНИЯ КРИОСРЕЗОВ С ТИРАМИДНОЙ АМПЛИФИКАЦИЕЙ СИГНАЛА

Д.С. Мялик^{1,2}, Е.В. Шурганова¹, Г.В. Шаронов^{1,3,4}

¹НИИ ЭОиТМ, Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород;

²Патологоанатомическое отделение, Нижегородский областной клинический онкологический диспансер,

Нижний Новгород; ³НИИ трансляционной медицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва; ⁴Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Привычный метод иммуногистохимического окрашивания (ИГХ) предполагает использования формалин-фиксированного парафин-заклоченного материала и имеет ряд ограничений. Подготовка образцов с длительной их фиксацией и последующей демаскировкой не позволяет сохранить антигены интактными и требует использования специализированных антител для их регистрации. В отличие от человеческих тканей, которые широко анализируют в клинической патологии, антитела для ИГХ мышечных тканей весьма ограничены и имеют низкую специфичность и/или избирательность. Для человеческих тканей также есть ряд ключевых антигенов для которые пока нет подходящих ИГХ антител. Использование криосрезов свежемороженой ткани обеспечивает высокую степень сохранности антигенов, но накладывает ограничения на процедуру пробоподготовки. В частности, в литературе пока не описаны методики многоцветной ИГХ с использованием системы тирамидной амплификации сигнала. В данной работе мы разработали протокол такой окраски, а именно: подобрали условия окрашивания, метод снятия антител между циклами окраски и способ фиксации окрашенного препарата. Разработанный протокол позволил нам успешно проводить 4-цветное окрашивание мышечной лимфоидной ткани с использованием антител для проточной цитометрии, в т.ч. антигенов, для которых в продаже нет подходящих ИГХ антител. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ22-15-20072.*

РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В МЕТАБОЛИЧЕСКОМ ОТВЕТЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ТЕРАПИЮ ДОКСОРУБИЦИНОМ

И.Н. Дружкова¹, Н.И. Игнатова¹, Е.Э. Никонова², А.М. Можеров¹, М.В. Зюзин³, И.Г. Корякина³, Е.А. Ширшин², В.И. Щеславский¹, Е.В. Загайнова⁴, М.В. Ширманова¹

¹ПИМУ МЗ РФ, Нижний Новгород; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ³Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург; ⁴Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

Большая часть исследований ответа опухолевых клеток на химиотерапию учитывает только роль факторов, связанных непосредственно с клетками. Однако известно, что компоненты межклеточного матрикса (МКМ) опосредуют реакцию клеток на токсическое воздействие за счет молекулярных взаимодействий и формирования механического барьера, препятствующего доступу препаратов к клеткам. Таким образом, моделирование сложных систем взаимодействия МКМ и опухолевых клеток для оценки токсического эффекта и разработка методик его оценки является важной задачей. Цель исследования: изучить распределение препарата доксорубицин в трехмерных моделях на основе коллагенового геля и оценить метаболический ответ опухолевых клеток с помощью время-разрешенной флуоресцентной микроскопии (fluorescence lifetime imaging, FLIM).

• Клетки рака мочевого пузыря человека T24 и нормальные фибробласты человека • микрофлюидные системы • метод генерации второй гармоники (ГВГ) для оценки структуры коллагена • FLIM для оценки метаболического кофактора НАД(Ф)Н • Электронная микроскопия • Стандартные методы оценки выживаемости

С помощью микрофлюидной системы было показано, что скорость распространения препарата доксорубицин в неструктурированном коллагеновом геле наименьшая по сравнению с системами без добавления геля или при наличии структурированного фибробластами коллагена. Метаболический имиджинг показал, что в опухолевых клетках, культивируемых без коллагена, наблюдалось быстрое увеличение вклада свободного НАД(Ф)Н и изменения во времени жизни НАД(Ф)Н, что в данном случае свидетельствует не о метаболических изменениях, а о поражении дыхательной цепи митохондрий. В системе же с коллагеном наблюдались изменения в противоположную сторону, что, вероятно, свидетельствовало об активации митохондриального дыхания. Анализ выживаемости после воздействия доксорубицина выявил более высокую жизнеспособность опухолевых клеток, культивируемых в коллагеновом геле.

Таким образом, нами установлено, что наличие и состояние коллагенового матрикса влияет на эффективность химиотерапии доксорубицином и характер метаболических изменений в опухолевых клетках. *Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава РФ (рег. номер АААА-А20-120022590098-0).*

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ: ОТ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПАТОГЕНЕЗА ДО РАЗРАБОТКИ ИННОВАЦИОННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ

МОДЕЛИРОВАНИЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ *IN VITRO* И *IN VIVO*

С.В. Беляков, А.Е. Банникова, А.А. Колачева, С.А. Сурков, В.Е. Блохин, М.В. Угрюмов

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

В связи со значительным увеличением продолжительности жизни, болезнь Паркинсона (БП) становится актуальной проблемой настоящего времени. Специфические для заболевания симптомы проявляются только через 20-30 лет после начала дегенерации, когда большая часть нейронов черной субстанции уже погибла. Это ограничивает разработку эффективной терапии и требует создания новых подходов к ранней диагностике заболевания. Одним из выходов может быть создание экспериментальных моделей для разных стадий БП. Данные модели могут пролить свет на молекулярные механизмы дегенерации специфических нейронов мозга, что может способствовать поиску как новых биомаркеров для ранней диагностики заболевания, так и новых кандидатов для нейропротекторной терапии.

В нашей лаборатории были разработаны и подробно охарактеризованы на молекулярном и биохимическом уровне нейротоксические экспериментальные *in vitro* и *in vivo* (мышь линии C57Bl/6) модели, воспроизводящие процесс постепенной дегенерации дофаминергических нейронов черной субстанции.

In vitro модель БП была разработана на клеточной линии мезенцефальных нейронов человека - LUNMES, дифференцированной в дофаминергические нейроны. Эта модель является, прежде всего, удобным инструментом для высокопроизводительного скрининга потенциальных нейропротекторов, так как позволяет на морфологическом уровне оценивать эффект препаратов. В свою очередь, моделирование заболевания именно на человеческих нейронах может позволить повысить специфичность животных моделей, за счет выявления общих как для человека, так и для животных механизмов дегенерации дофаминергических нейронов.

В свою очередь *in vivo* модели необходимы для детального тестирования потенциальных кандидатов не только на морфологическом, но и на молекулярно-биохимическом уровне и поведенческом уровне.

Таким образом, разработанные нами *in vitro* и *in vivo* экспериментальные модели БП являются единой платформой как для скрининга новых нейропротекторов, так и для исследования механизмов БП на различных уровнях. Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-15-2020-795, Соглашение № 13.1902.21.0027 от 29.09.2020).

СОЗДАНИЕ ПАНЕЛИ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА И РАЗРАБОТКА АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ВЕЩЕСТВ В ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ

В.Е. Блохин¹, А.В. Лаврова², Е.Н. Павлова¹, С.А. Сурков¹, В.В. Безуглов², М.В. Угрюмов¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН; ²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

За последние несколько десятилетий показано, существенное увеличение больных у которых диагностируют нейродегенеративные заболевания. Одним из таких заболеваний является болезнь Паркинсона (БП), характеризующаяся гибелью дофаминергических нейронов в чёрной субстанции. Это приводит к снижению дофамина в стриатуме и как следствие к нарушению моторики. Поскольку болезнь Паркинсона долгое время протекает бессимптомно, необходимо разработать раннюю диагностику - до проявления моторных симптомов. В данной работе был проведён скрининг изменений в крови (биомаркёров) у пациентов из группы риска развития БП с последующей их валидацией на *in vivo* мышинных моделях БП. В ходе исследований в плазме были обнаружены изменения концентрации L-DOPA, ДОФУК, уратов, сфинголипидов. Кроме того показано увеличение индекса оксидативного стресса, а также изменение экспрессии циркулирующих в плазме микро РНК и генов рецепторов к дофамину в лимфоцитах. Основываясь на в крови, была создана панель биомаркеров для ранней диагностики БП.

Вторым важным аспектом в борьбе с БП является предотвращение появления клинических симптомов заболевания с помощью превентивной нейропротекторной терапии. Для решения данной проблемы нами была разработана система адресной доставки веществ в дофаминергические нейроны полученных их вентрального мезенцефалона мышей на 13-й эмбриональный день. Основой транспортного комплекса является молекула GBR-12909 - селективный лиганд к транспортеру обратного захвата дофамина. В качестве «груза» использовался флуоресцентный краситель BODIPY. Показано, что полученный комплекс GBR-VP интернализуется в дофаминергические нейроны посредством связывания с транспортером обратного захвата дофамина путем клатринзависимого эндоцитоза и накапливается в теле дофаминергических нейронов. При этом последующее иммуноокрашивание меченых GBR-VP нейронов по тирозингидроксилазе показало, абсолютную колокализацию обоих меток. Было показано, что GBR-VP также интернализуется и в человеческие дофаминергические нейроны, полученные путем дифференцировки клеточной линии LUNMES.

Таким образом, нами была создана панель из 6 биомаркёров для ранней диагностики БП, а также разработана *in vitro* адресная доставка веществ в дофаминергические нейроны мыши и человека.

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-15-2020-795, Соглашение № 13.1902.21.0027 от 29.09.2020).

НОВЫЙ ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА НА ОСНОВЕ ПОИСКА БИОМАРКЕРОВ В ГУМОРАЛЬНЫХ СРЕДАХ И ПРОВОКАЦИОННОГО ТЕСТА

В.В. Богданов, Е.Н. Павлова

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

Болезнь Паркинсона (БП) характеризуется длительным периодом скрытого течения. Моторные симптомы, по которым ставится диагноз, проявляются лишь после гибели более 50% nigrostriatalных дофаминергических нейронов и исчерпания компенсаторных механизмов. В настоящее время существует лишь симптоматическое лечение БП. Актуальность разработки ранней диагностики БП заключается в перспективе применения превентивной терапии и продлению доклинической стадии БП дольше ожидаемой продолжительности жизни. Современные подходы к ранней диагностике БП основаны на поиске биомаркеров в гуморальных средах организма (кровь, ликвор) у нелеченых больных на клинической стадии. Нами была предложена новая методология, основанная на валидации обнаруженных у таких пациентов биомаркеров на моделях доклинической и клинической стадий БП у мышей. При сравнении полученных данных у мышей при нейротоксическом моделировании БП с данными у пациентов на ранней клинической стадии мы можем выделить общие биомаркеры, которые будут характерными для патогенеза БП на доклинической стадии, при этом существенно сужая круг потенциальных диагностических биомаркеров доклинической стадии БП. В качестве объекта исследования нами была выбрана слезная жидкость, как доступная для неинвазивного сбора и богатая различными веществами среда. У животных при моделировании БП и пациентов показано увеличение уровня норадреналина и повышение активности альфа-2-макроглобулина в слезной жидкости. На модели доклинической стадии БП у мышей нами также был разработан провокационный тест- метод выявления функциональной недостаточности nigrostriatalной системы. Данный тест заключается в дозированном введении животным метилового эфира альфа-метил-пара-тирозина, ингибитора тирозингидроксилазы - ключевого фермента синтеза дофамина. Данный ингибитор позволяет кратковременно и обратимо вызвать снижение синтеза дофамина, приводящее к проявлению моторных нарушений у животных при моделировании доклинической стадии БП, но не у интактных животных. Для снижения системного влияния ингибитора был разработан способ его интраназального введения в геле-носителе. Была показана эффективность такого метода введения по сравнению с внутривенным способом, изучена фармакокинетика и безопасность. Вместе эти два подхода перспективны для ранней диагностики БП

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ГЛАУКОМНОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ НА МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОЙ ВНУТРИГЛАЗНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ ЖИВОТНЫХ

В.В. Тюлина¹, Д.В. Чистяков¹, С.В. Горяинов², М.П. Шевелева³, О.С. Ганчарова¹, С.В. Комаров⁴, А.И. Никольская⁵, В.О. Горбатенко⁵, В.Е. Бакшеева¹, П.П. Филиппов¹, С.Е. Пермяков³, Е.Н. Иомдина⁶, М.Г. Сергеева¹, И.И. Сенин¹, Е.Ю. Зерный¹

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ²Российский университет дружбы народов, Москва; ³Институт биологического приборостроения РАН, Пушино; ⁴Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени им. К.И. Скрябина, Москва; ⁵Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁶Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца, Москва

Глаукома представляет собой нейродегенеративное заболевание с комплексным патогенезом, который включает повреждение зрительного нерва, чаще всего вследствие хронической внутриглазной гипертензии, с последующей гибелью ганглиозных нейронов сетчатки (ГНС). Молекулярные механизмы, обуславливающие нейротоксические эффекты при глаукоме, остаются по большей части неизвестными. Работа посвящена исследованию указанных механизмов с помощью биохимического и мультиомиксного анализа поврежденной сетчатки, а также водянистой влаги (ВВ), аккумулирующей биомолекулы, секретируемые нейронами этой ткани. Разработана модель хронической внутриглазной гипертензии животных. Показано, что однократная инъекция в переднюю камеру глаза 2% метилцеллюлозы приводит к длительному повышению внутриглазного давления, вследствие чего развиваются гистологические признаки экскавации диска зрительного нерва и гибели ГНС, а также нарушения электрофизиологической активности сетчатки, т.е. изменения, характерные для глаукомы. Методом атомно-абсорбционной спектроскопии зафиксирован значительный рост концентрации ионов цинка в сетчатке и ВВ животных с экспериментальной глаукомой. С помощью газожидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией, охарактеризован метаболит ВВ животных (~ 180 соединений), где выявлены изменения содержания основных низкомолекулярных антиоксидантов при глаукоме, которые коррелируют со снижением общей антиоксидантной активности ВВ по данным метода ингибирования хемилюминесценции люминола. При этом обнаружено увеличение активности антиоксидантных ферментов ВВ, основным из которых является Zn²⁺-зависимая супероксиддисмутаза. С использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией, определены изменения сигнального липида А2 при глаукоме (18 соединений), которые включают повышение содержания продуктов фосфолипазы А2, в первую очередь, арахидоновой кислоты. Таким образом, впервые проведен комплексный молекулярный анализ глаукомы, результаты которого указывают на роль окислительного стресса в развитии нейродегенерации сетчатки, а также предполагают участие цинка и арахидоновой кислоты в качестве цитотоксических медиаторов при этом заболевании. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00123).*

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ В МОЗГЕ КРЫСЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ СУДОРОЖНОЙ АКТИВНОСТИ НА РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ ЭПИЛЕПСИИ

Е.М. Сулейманова, А.А. Карань, Ю.С. Спивак, А.А. Корягина, А.П. Большаков

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Нейровоспаление является одним из ключевых процессов в развитии патологии головного мозга при травмах, нейродегенеративных заболеваниях и эпилепсии. Воспалительный ответ на первичное повреждение запускает каскад процессов, приводящих к изменению возбудимости нейронов, длительным пластическим изменениям, дисфункции астроцитов, нарушению проницаемости ГЭБ и нейродегенерации, что в итоге может привести к развитию эпилепсии. С другой стороны, нейровоспаление способствует патогенезу тревожных и депрессивных расстройств, когнитивных нарушений. Мы исследовали изменение экспрессии ряда цитокинов в острый и латентный периоды после эпилептической активности при помощи ПЦР в реальном времени; а также провели исследование цитокинового профиля гиппокампа крыс. Работа проводилась на литий-пилокарпиновой и каинатной моделях судорог. У крыс после литий-пилокарпиновых судорог было обнаружено достоверное увеличение экспрессии интерлейкина IL-1 β в коре и гиппокампе в остром (24 часа) периоде после судорог. В латентный период (7 дней) экспрессия оставалась увеличенной в энторинальной коре и неокортексе (соматосенсорная, фронтальная кора). Экспрессия фракталкина была достоверно снижена по сравнению с контролем в энторинальной коре и неокортексе, но не изменилась в гиппокампе. Изменение экспрессии исследуемых генов было наиболее выраженным через 24 ч в неокортексе по сравнению с энторинальной корой и гиппокампом. При этом степень нейродегенерации в гиппокампе не влияла на уровень экспрессии IL-1 β и фракталкина. Анализ цитокинового профиля гиппокампа крыс был проведен через 24 ч после судорог, индуцированных каинатом. Всего было проанализировано 79 белков, которые одновременно определялись при помощи кита Proteome Profiler Rat XL Cytokine Array. Было обнаружено значительное увеличение количества серпина PAI-1, IGFBP-5 и IGFBP-6. Существуют данные о том, что повышение уровня PAI-1 в ряде структур мозга, включая гиппокамп, ассоциировано с тревожными и депрессивными расстройствами, а IGFBP-5 и IGFBP-6 участвуют в регуляции клеточной дифференциации и гибели. Таким образом, эти белки могут быть мишенями исследований патологических процессов, ассоциированных с эпилептической активностью. *Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, проект № 20-015-00468.*

ТАРГЕТНАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ *LRRK2*

Т.С. Усенко^{1,2}, К.С. Башарова¹, А.И. Безрукова¹, Е.В. Григорьева³, Г.В. Байдакова⁴, М.А. Николаев^{1,2}, С.В. Павлова³, И.В. Милюхина⁵, С.П. Медведев³, Е.Ю. Захарова⁴, С.М. Закиян³, С.Н. Пчелина^{1,2}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург;

³Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск; ⁴Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова, Москва; ⁵Институт моза человека РАН, Санкт-Петербург

Обсуждается перспектива использования ингибиторов *LRRK2* для лечения болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене богатой лейциновыми повторами киназы 2 (*LRRK2*) (*LRRK2*-БП). Ранее было показано, что ингибирование активности *LRRK2* ингибитором MLI-2 приводит к увеличению активности фермента глюкоцереброзидазы (GCase).

Цель: оценить влияние селективного ингибитора киназной активности *LRRK2* MLI-2 на активность лизосомных ферментов в первичной культуре макрофагов периферической крови и на культуре дофаминергических нейронов (ДН), полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов с *LRRK2*-БП и неврологически здоровых индивидумов.

Мононуклеарная клеточная фракция с помощью центрифугирования в градиенте фикола для дальнейшей дифференцировки в макрофаги была получена от 2 пациентов с *LRRK2*-БП (2 - G2019S) и 2 индивидумов контрольной группы. Также была получена культура ДН пациента с *LRRK2*-БП, полученных из ИПСК от пациента с мутациями в гене *LRRK2* (1 - G2019S/N) и 1 контроля. Культивирование первичной культуры макрофагов и ДН, проводилось в трех повторах без и в присутствии ингибитора киназной активности *LRRK2* MLI-2 (Abcam, Англия). Активность лизосомных ферментов (альфа-галактозидаза (GLA), кислая сфингомиелиназа (ASMase), кислая альфа-глюкозидаза (GAA), альфа-L-идурунидаза (IDUA), галактозилцереброзидазы (GALC)) оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Эффективность ингибирования киназной активности *LRRK2* ингибитором MLI-2 оценивали по соотношению уровня белка Rab10 к его фосфорилированной форме.

Ингибитор MLI-2 увеличивал активность GCase у пациентов с *LRRK2*-БП, как в первичной культуре макрофагов, так и в культуре ДН ($p=0.032$, $p=0.042$, соответственно). Впервые было показано увеличение активностей лизосомных ферментов ASMase, GALC, GAA, GLA, IDUA у пациентов с *LRRK2*-БП в присутствии ингибитора MLI-2 ($p<0.05$) и также выявлено увеличение активности IDUA ($p=0.036$) в культуре ДН пациентов с *LRRK2*-БП. Интересно отметить, что влияние ингибитора MLI-2 на активность лизосомных ферментов была также выявлена и на культуре ДН контроля ($p<0.05$).

Наши результаты позволяют предположить роль *LRRK2* в регуляции не только активности GCase, но и других лизосомных ферментов. *Исследование поддержано грантом РФФ №22-25-00501.*

НЕЙРОФИЗИОЛОГИЯ. МОЛЕКУЛЯРНАЯ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЯ

МАРКЕРЫ ДЕПРЕССИВНОГО СОСТОЯНИЯ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В ГИППОКАМП КРЫСАМ

Д.А. Борозденко, Д.И. Гончар, Я.В. Голубев

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва

Патофизиология клинической депрессии может быть связана с нарушением баланса моноаминов, нейроэндокринными нарушениями, а так же с неспецифическим воспалением. Было выявлено, что объем изменения гиппокампа у пациентов, можно использовать как предиктор тяжести депрессивного расстройства. Введения LPS в гиппокамп для моделирования депрессии у грызунов, затрагивает метаболизм нейротрансмиттеров, нейровоспаление и также изменяет объем гиппокампа. Цель работы: оценка изменений концентрации моноаминов, объема гиппокампа и других биохимических маркеров в модели депрессивного состояния у крыс путем стереотаксического введения LPS в гиппокамп. 20 крыс-самцов Wistar были разделены на опытную (n=7), группу ложнооперированных животных (n=7) и интактных (n=6). LPS вводился в дозе 50 мкг/крыса по 3 мкл, по координатам: AP:-3, ML:2, DV:3. Объем гиппокампа оценивали по MPT до введения LPS, на 3, 7 и 14 день после моделирования депрессии. Концентрацию моноаминов измеряли в коре, гиппокампе и стриатуме методом ВЭЖХ-МС. Измеряли уровень кортикостерона в плазме методом ELISA. Для сравнения групп был проведен двухфакторный ANOVA тест с уровнем значимости 5%. Входе MPT сканирования выявлено, что объем гиппокампа увеличивался на 3 сутки у опытной и ложнооперированной группы. На 14 сутки после моделирования, объем гиппокампа достоверно снижался у крыс с инъекцией LPS (12±3,6; 15±2,8; 14,2±3,2) для опытной, ложнооперированной и интактной группы соответственно. У депрессивных животных статистически значимо снижался серотонин и дофамин в гиппокампе и стриатуме, а в коре головного мозга выявлено уменьшение серотонина и увеличение дофамина по сравнению с ложнооперированными и интактными крысами. Уровень кортикостерона был несколько повышен у опытной группы. При моделировании депрессии введением LPS в гиппокамп крысам, для объективного подтверждения развития депрессивного состояния, кроме оценки поведения, необходимо оценивать дисбаланс серотонина и дофамина в структурах мозга, а также снижение объема гиппокампа по MPT. Данная работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-73-20250.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИХ ИСТОЧНИКОВ Ca²⁺, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ГЕНЕРАЦИЮ АСИНХРОННОГО ВЫБРОСА НЕЙРОМЕДИАТОРА В ТОРМОЗНЫХ СИНАПСАХ ГИППОКАМПА

А.А. Вазетдинова¹, Ф.Ф. Валиуллина-Рахматуллина¹, А.В. Розов^{1,2}

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

²Институт фундаментальной неврологии, Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва

Холецистокинин – экспрессирующие интернейроны (ССК+) в гиппокампе обеспечивают перисоматическое торможение постсинаптических пирамидных клеток. Существуют утверждения, что ССК+ интернейроны функционально специализированы для регуляции эмоционального поведения, такого как настроение, тревога, страх, которые в свою очередь могут привести к психологическим расстройствам, как стресс и депрессия. Считается, что это связано со способностью ССК+ интернейронов управлять сетевыми колебаниями в тета-частоте, поскольку они вызывают медленные, асинхронные тормозные события у своих мишеней. Детальное изучение механизмов, лежащих в основе асинхронного выброса нейромедиатора, необходимо для лучшего понимания нормального и патологического функционирования мозга. Хотя молекулярный механизм, участвующий в генерации асинхронного выброса нейромедиатора, относительно хорошо изучен, источник Ca²⁺, обеспечивающий длительное слияние везикул, остается неясным. Основной целью этого проекта являлась проверка возможного вклада различных источников повышения пресинаптического Ca²⁺ и генерации асинхронного выброса нейромедиатора в синапсах между ССК+ интернейронами и пирамидными клетками CA1. Все эксперименты проводились на переживающих срезах гиппокампа мышей (P14-21) с использованием одновременных парных записей от связанных нейронов. Мы обнаружили, что асинхронный выброс нейромедиатора в синапсах между ССК+ интернейронами и пирамидными клетками не требует активации проницаемых для кальция рецепторов NMDA каналов, пресинаптических ваниллоидных рецепторов (TRPV-1) или высвобождения Ca²⁺ из внутренних депо. Наши данные свидетельствуют о том, что функциональная экспрессия Ca²⁺-АТФазы снижена в изучаемых терминалях, что естественно приводит к замедлению вывода Ca²⁺. Более того блокада реверсивного входа Ca²⁺ через Na⁺/Ca²⁺-обменник существенно снижала длительность и интеграл асинхронного выброса нейромедиатора. Таким образом, асинхронный выброс нейромедиатора в ССК+ синапсах запускается Ca²⁺ остающемся в терминалях после пачки ПД, а необходимая для выброса медиатора концентрация поддерживается за счёт снижения скорости вывода Ca²⁺ и за счёт реверсивного входа Ca²⁺ через Na⁺/Ca²⁺-обменник. Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ 22-15-00293.

РАННИЕ ОСТРЫЕ ВОЛНЫ В ГИППОКАМПЕ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС, ВЫЗВАННЫЕ СОМАТОСЕНСОРНОЙ СТИМУЛЯЦИЕЙ

Г.Р. Валеева¹, А.Р. Гайнутдинов^{1,2}, М.Ю. Синцов¹, Д.Д. Шипков¹, Р.Н. Хазипов^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ²Средиземноморский институт нейробиологии, Марсель, Франция

Гиппокамп является структурой, интегрирующей сенсорную информацию различных модальностей для формирования полной картины окружающей среды. Известно, что у взрослых животных соматосенсорные, слуховые и зрительные стимулы вызывают гиппокампальные ответы в виде дефлексии локального полевого потенциала (ЛПП) и изменения генерации потенциалов действия (ПД) нейронами гиппокампа. Во время ответов на соматосенсорную стимуляцию происходит активация альвеолярного и перфорантного путей, сопровождающаяся активацией синапсов в лакунарно-молекулярном слое CA1 об-

ласти и молекулярном слое зубчатой извилины (ЗИ) соответственно. При этом происходит активация нейронов гранулярного слоя ЗИ и, по большей части, угнетение нейронов пирамидного слоя CA1 области гиппокампа. В первую неделю постнатального развития у крыс и мышей зрительная и слуховая информация еще не достигает кортикальных структур мозга. В этих условиях увеличивается доля соматосенсорных сигналов в общем потоке сенсорной афферентации. Однако электрофизиологические свойства гиппокампальных ответов на соматосенсорную стимуляцию у новорожденных животных остаются не изученными. В данной работе мы регистрировали гиппокампальные ответы на электрическую стимуляцию кожи с помощью внеклеточного многоканального электрода, расположенного вдоль оси CA1-ЗИ у крыс в возрасте 4-7 дней после рождения. Было показано, что соматосенсорные стимулы вызывают у новорожденных крыс генерализованные миоклонические движения, за которыми следует генерация ранних острых волн (рОВ) в гиппокампе. Вызванные стимуляцией рОВ были неотличимы от спонтанных рОВ по таким параметрам, как профиль плотности источников токов (ПИТ) и активация нейронов CA1 области и ЗИ. Карта ПИТ во время вызванных стимуляцией рОВ показала расположение областей синаптической активации в радиальном и лакунарно-молекулярном слоях CA1 области, а также в молекулярном слое ЗИ. Кроме того, вызванные стимуляцией рОВ сохранялись в условиях уретановой анестезии, при которой подавляются как спонтанные, так и вызванные стимуляцией миоклонические движения. Таким образом, в гиппокампе новорожденных крыс соматосенсорная стимуляция вызывает ответы, по форме ЛПП, карте ПИТ и характеру активности нейронов идентичные спонтанным рОВ. *Работа поддержана грантом РФФ № 21-75-10033.*

ДИНАМИКА СЕТЕВОЙ АКТИВНОСТИ В СЛОЯХ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ КРЫС ВО ВРЕМЯ РАСПРОСТРАНЯЮЩЕЙСЯ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ

Д.Е. Винокурова¹, К.А. Чернова¹, Г.Ф. Бурханова-Закирова¹, А.Р. Насретдинов¹, Р.Н. Хазипов^{1,2}

¹НИЛ нейробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ²Средиземноморский университет нейробиологии (INMED), Марсель, Франция

Предполагается, что распространяющаяся деполяризация (РД) является физиологическим субстратом ауры при мигрени. Мы исследовали динамику активности нейрональных сетей в слоях индивидуальной кортикальной колонки соматосенсорной коры крыс во время повторяющихся волн РД, вызванных длительной локальной аппликацией высокой концентрации калия, регистрируя локальные полевые потенциалы и потенциалы действия отдельных нейронов с помощью линейных 16-канальных электродов в режиме постоянного тока. Вызванные волны РД характеризовались высокоамплитудными негативными сдвигами потенциала, распространяющимися от поверхностных к глубоким слоям коры. Волнам РД предшествовали преходящие, длящиеся 3–10 с, эпизоды возбуждения нейронов, организованные в виде осцилляций в гамма-частоте. Данные гамма-осцилляции демонстрировали слой-специфичные свойства. Так, в 5/6 слое наблюдалась максимальная мощность и длительность гамма-осцилляций, а их генерация ассоциировалась с двумя фазами. В первой, «модулированной» фазе, осцилляции в 5/6 слое развивались одновременно с осцилляциями во 2 слое, при этом наблюдалась сильная согласованность фаз между слоями, что, вероятно, объясняется наличием синаптических входов в 5 слой от 2/3 слоев коры. После окончания осцилляций во 2/3 слое наблюдалась фаза «собственных» гамма-осцилляций в 5/6 слое. В 4 слое, напротив, мощность и длительность осцилляций были минимальными. Сенсорно-вызванные ответы и спонтанная дельта-волновая активность прогрессивно снижались во время гамма-осцилляций и полностью подавлялись во время негативных сдвигов потенциала одновременно с распространением РД по слоям. Восстановление и сенсорно-вызванной, и спонтанной активности после РД происходило быстрее в глубоких, чем в поверхностных слоях коры. При этом сенсорно-вызванные ответы восстанавливались в течение 5–6 минут от начала РД, а спонтанная активность демонстрировала более медленную динамику восстановления и оставалась подавленной на протяжении более чем 15 минут после РД. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что в основе позитивных и негативных симптомов мигренозной ауры лежит волна кратковременного гамма-возбуждения, за которой следует длительная депрессия электрической активности вследствие прохождения волны РД. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-15-00236.*

ВИРУС КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА – ТРИГГЕР ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОЙ ФОРМЫ ЭПИЛЕПСИИ?

П.А. Григорьева¹, Е.Н. Скитева², Ю.М. Забродская², Н.М. Парамонова^{3,4}

¹НМИЦ им. В.А. Алмазова МЗ РФ; ²НМИЦ им. В.А. Алмазова, Нейрохирургический институт им. Поленова; ³Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН; ⁴Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины МО РФ, Санкт-Петербург

Эпилепсия – тяжелое заболевание нервной системы, сопровождающееся эпилептическими припадками вследствие повышенной возбудимости нейронов. Фармакорезистентная эпилепсия (ФРЭ) – её осложненная форма, при которой медикаментозное лечение не приводит к должному терапевтическому эффекту – остаётся актуальной проблемой на протяжении многих лет. Предложена гипотеза, что вызванные судорогами дегенерация и ремоделирование нейронной сети способствуют аномальному её развитию и резистентности к лекарственным средствам. С целью уточнения патогенеза ФРЭ исследовали ультраструктуру кусочков биопсии, полученных в результате передневисочных резекций от больных под контролем электрокортикографии. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии были обнаружены дегенеративно измененные нейроны с преобладанием апоптозов, деструкция синапсов – рассредоточение синаптических везикул по аксонной терминали без выраженной локализации вблизи активной зоны. Миелиновые волокна (МВ) имели различные повреждения миелина и/или осевого цилиндра: гипермиелинизацию, истончение миелиновой оболочки и ее разрывы. МВ имели расслоение ламелл, участки с мембранным гомогенным, зернистым, везикулярным распадом миелина. Осевые цилиндры состояли из утолщенной аксоплазмы с нарушением цитоскелета, деструкцией органелл и периаксональным отеком. Признаки апоптоза отмечены у 40% глиальных клеток. Гематоэнцефалический барьер содержал капилляры и микрососуды с неравномерно утолщенной рыхлой базальной мембраной, пронизанной коллагеновыми волокнами, иногда с чертами сосудистых мальфор-

маций и выраженным периваскулярным отеком. Неожиданной находкой оказалось наличие внутриядерных телец (NB) в кариоплазме эндотелио- и перичитов, а также олигодендроцитов, локализованных вблизи сосудов, включений, характерных для перенесенного клещевого энцефалита. Среди наиболее частых причин эпилепсии, и ФРЭ, в частности, выделяют наследственность, ЧМТ, острые и хронические интоксикации, нарушения мозгового кровообращения, онкологию, нейродегенеративные заболевания, а также паразитарные и инфекционные поражения мозга. Т. о., на основе исследования ультраструктуры мозга пациентов из Санкт-Петербурга, эндемичного района по клещевому энцефалиту, можно предложить его на роль триггера возникновения фармакорезистентной формы эпилепсии.

СВЕРХМЕДЛЕННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ВО ВРЕМЯ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Б.Р. Мингазов¹, А.В. Захаров^{1,2}, Д.Е. Винокурова¹, Р.Н. Хазипов^{1,3}

¹НИЛ Нейробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ²Казанский государственный медицинский университет, Казань; ³Средиземноморский университет нейробиологии (INMED), Марсель, Франция

Сверхмедленные отрицательные потенциалы (СОП), достигающие гигантских значений в -150 мВ при субдуральной записи, недавно были обнаружены с помощью Pt/Ir-электродов у пациентов с фокальной и глобальной ишемией головного мозга. Однако, механизмы СОП остаются плохо изученными. Мы исследовали сверхмедленные потенциалы (СП), с помощью интракортикальных регистраций 16-канальными Ir-электродами и Ag/AgCl-стеклянными электродами во время терминальной ишемии мозга у крыс (n = 10), вызванной летальной ингаляцией изофлюрана. Референсный Ag/AgCl-электрод помещался в мозжечок. Индуцированная изофлюраном остановка дыхания запускала развитие гиперполяризации, амплитуда которой достигала 37[27-40] мВ и 4[3-5.5] мВ на Ir- и Ag/AgCl-электродах, соответственно. Далее возникала терминальная распространяющаяся деполяризация, которая всегда предшествовала СП. Развитие СП характеризовалось двумя последовательными фазами. Первая фаза описывалась негативным сдвигом внеклеточного потенциала и длилась около 8 мин, достигая -40[-58- -26] мВ на Ir-электродах и -6,5[-9,5- -2,05] мВ на Ag/AgCl-электродах. Вторая фаза на Ir-электродах логически продолжала негативный сдвиг первой фазы, достигая значений в -81[-113- -58.5] мВ спустя 1.5 часа после подачи изофлюрана. Однако, на Ag/AgCl потенциал имел положительную динамику и достигал значений в 12[3-25] мВ. Момент смены фаз был синхронизирован на Ir- и Ag/AgCl-электродах. Таким образом, мы впервые показываем разную кинетику протекания терминальных процессов на Ir- и Ag/AgCl-электродах в коре головного мозга крыс. Работа выполнена за счёт средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030). Работа выполнена за счёт средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности, проект № 0671-2020-0059.

НЕЙРОТРОПНЫЕ И ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ НОВЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОСУЛЬФОКИСЛОТ

Н.М. Киселева, Д.А. Борозденко, Т.А. Шмиголь, А.А. Ездоглян, В.В. Негребецкий

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва

Тесные нейроиммунные взаимодействия привлекают в настоящее время исследователей различных областей. Некоторые нейротропные препараты, например, фенотропил, обладают достаточно выраженной иммунотропной активностью. Поиск новых средств, обладающих одновременно иммуномодулирующей и нейротропной активностью несомненно является актуальной задачей медицины. Цель исследования. Оценить нейротропные и иммуномодулирующие свойства новых гетероциклических производных аминсульфокислот. Материалы и методы. В отделе медицинской химии и токсикологии НИИ трансляционной медицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ синтезированы соединения из класса гетероциклических производных аминсульфокислот под лабораторными шифрами VRF_11, 5-18. In vitro оценивали нейротропную активность в модели глутаматной токсичности, in vivo исследовали поведение интактных крыс в тестах открытое поле, темно-светлая камера, тесте форсированного плавания. Концентрации моноаминов изучали в гомогенатах структур головного мозга методом ВЭЖХ. Также было изучено влияние исследуемых веществ в концентрациях 0,5 и 0,1 мг/мл на цитокиновый профиль ЛПС стимулированных макрофагов методом проточной цитофлуориметрии. Результаты. Оба соединения повышали содержание дофамина и снижали содержание серотонина во фронтальной коре головного мозга интактных крыс в дозах эквивалентных 300 мг пиретама. Добавление растворов VRF_11 или 5-18 приводило к снижению гибели культивированных нейронов в модели глутаматной токсичности. После 10-дневного курса внутривентрикулярных инъекций VRF_11 (250 мг/кг), 5-18 (200 мг/кг), пиретама (300 мг/кг) и раствора 0.9% NaCl исследуемые соединения снижали двигательную активность крыс в тесте открытое поле, уменьшали тревожность в тесте темно-светлой камеры. 5-18 также уменьшал время иммобильности в тесте форсированного плавания. При инкубации клеток в растворах VRF_11, 5-18 в обоих концентрациях увеличивалась продукция ИЛ4 и снижалась продукция ИЛ10 и ИЛ17А. Таким образом, новые гетероциклические производные аминсульфокислот VRF_11 и 5-18 обладают нейротропным эффектом, изменяя поведение интактных животных и изменяют цитокиновый профиль макрофагов. Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания № АААА-А18-118051590108-1, гранта РНФ 21-73-20250.

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИЙ ВЕЗИКУЛЯРНЫХ ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ В НЕЙРОНАХ НА ПРИМЕРЕ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2

С.В. Чепур¹, Н.М. Парамонова^{1,2}, В.А. Мясников¹, М.А. Тюнин¹, Н.С. Ильинский¹, Н.Н. Плужников¹

¹Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины МО РФ;

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

Кроме источника пандемической ситуации инфекция SARS-CoV-2 стала инструментом изучения функционирования транспортных систем в нервных клетках. Присутствие вируса в нейронах, в отличие от альвеолоцитов, длительное время не приводит к массовой гибели клеток неокортекса сирийских хомяков и позволяет проследить особенности взаимодействия элементов везикулярных транспортных систем. С применением стандартных электронно-микроскопических техник в динамике SARS-CoV-2-инфекции выявлены морфологические эквиваленты сформированной гипотезы транспорта вируса (Saraste, Prydz, 2021) и проведено её дополнение. В нейронах прослежены три пути движения коронавируса. После синтеза белки вирусной мембраны включаются в транспортные везикулы в местах терминальных канальцев эндоплазматического ретикула (ЭР) и мигрируют в промежуточный компартмент (ПК), совокупность гладкостенных мембранных везикул между ЭР и аппаратом Гольджи (АГ). На ранних стадиях инфекционного процесса (3 сутки после заражения) вирусные копии поступают в АГ в транспортных везикулах, сформированных мембранами ПК. Из-за больших размеров вирусные частицы ограничены расширенными концами подвижных цистерн АГ, что отчетливо прослежено на электрограммах. Реализация этого пути предполагает целостность АГ. При морфологически доказанной деструкции мембран АГ к 7 суткам инфекционного процесса можно предположить, что сами везикулы ПК во взаимодействии с сохранившимися мембранными элементами АГ или самостоятельно выполняют транспортную функцию по доставке вируса к периферии клетки и далее в межклеточное пространство, на конечном этапе сопрягаясь с эндосомно-лизосомной системой клеток. Подобный сценарий предполагает транслокацию гликозидаз АГ, необходимых для декорирования вирусных белков, в везикулы ПК. В отростках нейронов прослежен также транспорт зрелых вирусных частиц, ассоциированных с элементами цитоскелета, что не выявляли в других локусах персистенции вируса. Оболочечные вирусы часто используют в качестве моделей для изучения секреторного процесса, поскольку белки вирусных мембран, захватывающие транспортные механизмы клетки-хозяина, следуют тем же внутриклеточным маршрутам, что и их эндогенные клеточные аналоги.

ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА МЕТФОРМИНОВОЙ ТЕРАПИИ У КРЫС С ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННЫМ МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Н.М. Парамонова^{1,2}, О.В. Чистякова¹, И.Б. Сухов¹, К.В. Деркач¹, В.М. Бондарева¹, А.О. Шпаков¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН; ²Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины МО РФ, Санкт-Петербург

Метаболический синдром (МС), представляющий собой широко распространенное комплексное заболевание, характеризуется гипергликемией, инсулиновой резистентностью и нарушением функций сосудов. Одним из основных препаратов для его лечения является метформин (МФ), который повышает чувствительность тканей к инсулину и нормализует углеводный и липидный обмен. Наряду с периферическим эффектом терапии МФ, в настоящее время интенсивно изучаются центральные механизмы действия этого препарата, в том числе влияние МФ на структуру и функциональную активность различных отделов мозга. Целью работы было, используя трансмиссионную электронную микроскопию, исследовать ультраструктуру сенсомоторной коры крыс с МС, вызванным высококалорийной диетой (15 недель), которых в течение 4 недель лечили МФ (200 мг/кг/сутки). Показано, что МФ терапия оказывала выраженное защитное действие на неокортекс МС-крыс. Количество погибших нейронов и глиальных клеток в сенсомоторной коре у леченых МФ животных уменьшалось в среднем в 4 раза, что указывает на выраженный антиапоптотический эффект МФ терапии. Уменьшалось также число нейро-вазальных контактов, свидетельствующее о снижении степени гипоксии. Повышалось число коллатералей, включенных в процесс кровотока. Достаточно неожиданным было сохранение и даже небольшое повышение в сенсомоторной коре МС-крыс, леченых МФ, числа кровеносных сосудов с выраженным периваскулярным отеком – оно составило 71%, и было выше такового у МС-крыс без лечения (58%) и у контрольных животных (43%). Отмечали набухание как периваскулярных астроцитов, формирующих нейро-вазальные единицы мозга, так и их отростков. Мы полагаем, что отечная астроцитарная «подушка» между нейронами и клетками сосудистой стенки может быть вовлечена в транспорт и утилизацию глюкозы в условиях избыточного ее содержания в нейронах при системной гипергликемии больных с МС. Таким образом, длительная МФ терапия крыс с диета-индуцированным МС повышает выживаемость нейронов и глиальных клеток, нормализует кровоснабжение, но при этом не снимает периваскулярный отек сосудов в исследуемом отделе неокортекса. Полученные нами данные свидетельствуют о защитном эффекте МФ на клетки сенсомоторной коры, а также о том, что эта область мозга является одной из мишеней МФ терапии.

РОЛЬ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СИНАПСОВ В РЕВЕРБАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ

С.С. Сергеева¹, Н.М. Парамонова² ¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург;

²Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, Санкт-Петербург

Общепризнанной функцией протеаз является протеолиз - ферментативный гидролиз амидных связей в белках и пептидах, в связи с этим протеазы используются при выделении отдельных клеток для создания культуры клеток и тканей. В наших экспериментах, проведенных на нервных ганглиях лягушки, моллюска и пиявки, ставилась задача не диссоциируя ганглий проназой на отдельные нейроны получить безглиальную нервную сеть, состоящую из взаимосвязанных нервных клеток. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии выявлено, что ретракция и удаление глиальных оболочек, денудация нервных волокон вызвали сближение нейромембран этих структур, способствуя образованию различных межклеточных

контактов, в том числе ЦК, а также деструктивно-дезорганизирующее действие проназы на пре- и постсинаптические специализации нейронов, приводящее к полной дисфункции химических синапсов. Таким образом, в результате ремоделирования проназой нервной сети ганглия, создана модель нервной системы, нейроны которой связаны исключительно электрическими синапсами. Электрофизиологические исследования, проведенные на нейронах ганглия пиважки, показали, что созданные *de novo* цепочки ЦК на мембранах нервных волокон функционируют как ЭС, формируя в нервной сети особую пачечную электрическую активность - реакцию реверберации. В настоящее время значительное количество ЭС выявлено практически в каждой структуре головного мозга млекопитающих, где они образуют сети связанных нейронов, что предполагает их участие в норме и при патологии. Изучение свойств и особенностей ЭС в нашей модели простой нервной системы имеет ряд преимуществ в исследовании вклада ЭС в сложные нейронные механизмы.

НЕЙРОНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЕ УЧАСТИЕ ЯДЕР ШВА В КОНТРОЛЕ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ БОЛЕВЫХ СИГНАЛОВ

Б.М. Сушкевич¹, А.А. Михалкин¹, О.А. Любашина^{1,2}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН; ²Институт фармакологии им. А.В. Вальдмана, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург

К настоящему времени накоплен значительный объем знаний об участии серотониновой системы головного мозга в супраспинальном контроле болевой чувствительности. Однако эти сведения преимущественно получены при изучении соматической боли. Между тем установлено, что соматическая и висцеральная боль отличаются не только по клиническим характеристикам, но и обеспечивающим их центральным нейрофизиологическим механизмам. Это указывает на возможность дифференцированно вовлечения в процессы висцеральной и соматической ноцицепции, в том числе серотонинергических структур мозга. Однако до сих пор этот вопрос остается практически неизученным. Целью нашего исследования являлось выяснение особенностей реакций нейронов большого (БЯШ) и дорсального (ДЯШ) ядер шва на висцеральные и соматические болевые стимулы. Работа выполнена на анестезированных уретаном самцах крыс линии Вистар с применением микроэлектродной внеклеточной регистрации активности нейронов и иммуногистохимического определения ко-экспрессии в них с-Fos белков и серотонина (5-НТ). При регистрации импульсной активности в БЯШ и ДЯШ были выявлены три группы нейронов: возбуждающиеся только при соматической болевой стимуляции (сдавливание хвоста пинцетом), отвечающие только на висцеральный стимул (растяжение кишки баллоном) и реагирующие на оба вида раздражения. В обоих ядрах нейроны разных групп отвечали на соматический стимул с большей интенсивностью, чем на висцеральный. Однако для ДЯШ были характерны более сильные реакции клеток на растяжение кишки и большая по численности специализированная «висцеральная» группа. При иммуногистохимическом анализе существенное увеличение количества с-Fos/5-НТ клеток в обоих ядрах было отмечено только после соматического болевого воздействия, тогда как висцеральный стимул активировал в них нейроны неопределенной нейрохимической популяции с более мелкими с-Fos-позитивными ядрами. Полученные данные свидетельствуют о селективном участии большого и дорсального ядер шва в супраспинальном контроле разных видов ноцицепции. Рецепентами разных типов болевых сигналов в этих структурах являются функционально и нейрохимически различные популяции нейронов, при этом серотонин-синтезирующие клетки являются реактивными только к соматической боли.

КЛЕТочНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕРАЦИИ ГАММА ОСЦИЛЛЯЦИЙ В ТАЛАМУСЕ НОВОРОЖДЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

М.Г. Шерозия, Р.Н. Хазипов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Спонтанная и сенсорно-вызванная активность нейронов играет важную роль в процессе формирования нейронной сети. Таламокортикальная система у новорожденных грызунов генерирует ранние гамма и альфа осцилляции. Ранее было высказано предположение, что обе ранние активности могут генерироваться таламусом, однако, клеточные механизмы оставались малоизученными. Для того, чтобы исследовать таламические механизмы ранних форм сетевых осцилляций, мы регистрировали экстраклеточную и внутриклеточную (пэтч кламп) активность таламокортикальных клеток в соматосенсорном таламусе анестезированных уретаном крыс возрастом 6-7 дней. Регистрация вызванной активности в таламусе проводилась как с интактной корой мозга, так и в условиях с удаленной корой. Отклонение только одной вибриссы приводило к генерации спайков данной таламической клеткой. На внутриклеточном уровне, сенсорная стимуляция вызывала серию (3-8 штук) высокоамплитудных деполяризующих постсинаптических потенциалов и многочисленные гиперполяризующие постсинаптические потенциалы. Данная вызванная таламическая активность регистрировалась как с интактной корой мозга так и в условиях с удаленной корой. Высокоамплитудные деполяризующие потенциалы следовали с интервалом 100-200 мс. Гиперполяризующие постсинаптические события имели тенденцию формировать интервалы 20-40 мс. Один деполяризующий потенциал вызывал пачку из нескольких спайков (частота в пачках 50-100 Гц) и/или деполяризационный блок. При наложении деполяризующих и гиперполяризующих потенциалов частота спайкования модулировалась торможением и уменьшалась до диапазона 20-40 Гц. В соответствии с современными данным, высокоамплитудные деполяризующие потенциалы генерировались так называемыми таламическими драйверами (гигантские синапсы на таламокортикальных клетках, которые образуют сенсорные входы). Таким образом, в основе генерации ранних гамма осцилляций может лежать активность небольшого числа крупных возбуждающих синапсов на таламокортикальных клетках с обратной связью от тормозных клеток ретикулярного ядра таламуса.

Работа поддержана грантом РФФИ 20-04-00858.

ВКЛАД ПЕРВИЧНОЙ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ В ГЕНЕРАЦИЮ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ РАННИХ ОСТРЫХ ВОЛН У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС *IN VIVO*

Д.Д. Шипков¹, Г.Р. Валеева¹, Р.Н. Хазипов^{1,2} ¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ²Средиземноморский институт нейробиологии, Марсель, Франция

Ранние острые волны (рОВ), регистрируемые у новорожденных крыс и мышей *in vivo*, являются доминирующим паттерном спонтанной сетевой активности в гиппокампе в течение первой недели постнатального развития. рОВ возникают вслед за физиологическими миоклоническими движениями конечностей и тела животного. В современном представлении эта связь между движением и рОВ осуществляется за счет афферентации от движений, которая посредством лемнискального пути вызывает таламо-кортикальные всплески активности в первичной соматосенсорной коре, а затем через ассоциативные зоны неокортекса в медиальной энторинальной коре, которая, в свою очередь, запускает генерацию рОВ в гиппокампе. Согласно нашей гипотезе, взаимосвязь миоклонических движений с активностью в гиппокампе может быть также опосредована активацией ретикуло-лимбического пути и в меньшей степени зависеть от активации лемнискального пути и соматосенсорной коры. Для проверки данной гипотезы мы удаляли представительство вибрисс в первичной соматосенсорной коре (бочонковая кора) правого полушария мозга и с помощью многоканального внеклеточного электрода проводили регистрацию рОВ в гиппокампе противоположного полушария в ответ на электрическую стимуляцию кожи с левой и правой сторон мордочки новорожденной крысы в области вибрисс. В первом случае активация гиппокампа производилась посредством активации ретикуло-лимбического пути, а во втором – посредством активации ретикуло-лимбического пути и бочонковой области соматосенсорной коры. Эксперименты проводились под уретановой анестезией. В двух условиях активации гиппокампа оценивали такие характеристики рОВ, как расположение активных синаптических входов по слоям гиппокампа, вероятность возникновения рОВ в ответ на соматосенсорную стимуляцию, амплитуда рОВ, задержка рОВ относительно стимула. Достоверных различий в параметрах рОВ, возникающих в ответ на электрическую стимуляцию мордочки с правой и левой сторон, мы не обнаружили. Полученные результаты свидетельствуют о преобладающем значении ретикуло-лимбического пути для генерации рОВ в гиппокампе новорожденных крыс. *Работа поддержана грантом РФФ № 21-75-10033.*

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ВЫЖИВАЕМОСТИ НЕЙРОНОВ ПОСЛЕ АНОКСИЧЕСКОЙ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ В МОДЕЛИ КИСЛОРОДНО-ГЛЮКОЗНОЙ ДЕПРИВАЦИИ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС *IN VITRO*

Э.Р. Юзекаева¹, А.Р. Гайнутдинов^{1,2}, М.Р. Мухтаров¹, Р.Н. Хазипов^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ²INMED/INSERM UMR1249, Aix-Marseille University, France

Аноксическая деполяризация (АД) является отличительным признаком ишемического повреждения головного мозга. АД считается терминальным событием во время кислородно-глюкозной депривации (КГД) в кортикальных срезах мозга *in vitro*. Тем не менее, аспекты развития гибели нейронов после АД остаются в значительной степени неизвестными. Мы использовали непрерывные патч-кламп записи нейронов из кортикальных срезов мозга крыс возраста P1 – 14 (новорожденные) и P15 – 28 (ювенильные) и показали, что подавляющее большинство нейронов слоя L4 необратимо теряют свой мембранный потенциал после АД. Для оценки выживаемости нейронов мы использовали кратковременные записи нейронов (около 1 мин на нейрон) в контроле и в течение часа после АД (до 10 нейронов на срез мозга в каждом условии) с целью исключения влияния механического смещения ткани в результате ишемического отека на результаты измерений. Продолжительность ишемии регулировалась длительностью задержки начала реперфузии после пика АД. Короткие эпизоды ишемии без возникновения АД не вызывали гибель нейронов в обеих возрастных группах. При наличии АД количество выживших нейронов прогрессивно уменьшалось с увеличением возраста и длительности задержки начала реперфузии после АД. С увеличением продолжительности КГД скорость гибели нейронов достигала 1,3 (0,9 – 1,6) %/мин в срезах P1 – 14 и 2,4 (1,9 – 2,6) %/мин в срезах P15 – 28. 90 % летального исхода было достигнуто при задержке реперфузии после АД на 47 минут у новорожденных и на 32 минуты у ювенильных крыс. Таким образом, (i) АД в модели КГД не является терминальным событием, (ii) задержка реперфузии после АД имеет решающее значение для выживания нейронов и (iii) скорость гибели нейронов после АД увеличивается с возрастом. *Работа выполнена в сотрудничестве с Программой стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030); гранта РФФ № 22-15-00236 и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности, проект № 0671-2020-0059.*

ИЗМЕНЕНИЕ ВОЗБУЖДАЮЩЕГО ВХОДА НА НЕРВНУЮ КЛЕТКУ ВО ВРЕМЯ ВЫЗВАННОЙ ФОКАЛЬНОЙ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В НЕОКОРТЕКСЕ КРЫСЫ

В.В. Шумкова¹, В.Р. Ситдикова¹, М.Г. Минлебаев^{1,2}

¹НИЛ нейробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ²Средиземноморский институт нейробиологии при Национальном институте здоровья и медицинских исследований, Марсель, Франция

Эпилепсия – хроническое заболевание нервной системы, сопровождающееся периодическими приступами гиперсинхронной нейрональной активности. Считается, что одним из ее основных механизмов является доминирование возбуждения над торможением в нейронной сети. Однако, остается неизвестным, связано ли это смещение с увеличением возбуждающих или же с уменьшением тормозных входов? Чтобы ответить на данный вопрос, мы оценивали частоту глутаматных токов (основные возбуждающие токи в ЦНС) в контроле и во время вызванной эпилептической активности. Эксперименты проводились на взрослеющих крысах р18-27, где р0-день рождения. Использовался метод локальной фиксации потенциала (patch clamp) *in vivo*. Клетки регистрировались на мембранном потенциале покоя (-60 мВ) в контроле и во время вызванной эпилептической активности. Эпилептиформная активность вызывалась с помощью интракортикальной инъекции 4-аминопиридина (4-АП, 100 мМ, 0,5-1 мкл). Наши результаты показали, что эпилептиформная активность сопровождается усилением возбуждения в нейронной сети. Сравнение глутаматных токов показало увеличение частоты во время эпилептической активности.

В то время как в контроле средняя частота глутаматных токов составляет 1.1 ± 0.12 /сек. Во время 4-АП вызванной эпилептиформной активности частота глутаматных токов увеличивалась до 4.32 ± 0.47 /сек. Анализ синхронности показал, что во время эпилептической активности наблюдается прирост коэффициента модуляции в диапазоне ± 50 мс от тока. (контроль 0.52 ± 0.03 , эпилептиформная активность 0.67 ± 0.04). Это свидетельствует, что во время эпилептической активности токи становятся более синхронными. Несмотря на то, что для ответа на поставленный нами вопрос необходимо проведение дальнейших исследований, полученные нами предварительные данные говорят как об увеличении возбуждающего вклада, так и его синхронизации *in vivo*. Можно предположить, что эпилептическая активность приводила к сдвигу баланса в сторону возбуждения, что подтверждается с ранее продемонстрированными данными с использованием *in vitro* подходов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-25-00225

НОВЫЕ КОНЪЮГАТЫ 6-МЕТИЛУРАЦИЛА В КАЧЕСТВЕ РЕАКТИВАТОРОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПАРАОКСОН-ИНДУЦИРОВАННОЙ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ

И.В. Зуева¹, В.Э. Семенов¹, К.А. Петров¹, О.А. Ленина¹, Р.М. Каюмова^{1,2}, П. Массон²

¹Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, ФИЦ Казанский научный центр РАН;

²Казанский федеральный университет, Казань

Фосфорорганические соединения (ФОС) представляют серьезную опасность для здоровья человека во всем мире. Хорошо известно, что у выживших после воздействия ФОС проявляются неврологические нарушения, в том числе расстройства памяти. При этом, стандартная терапия отравлений ФОС эффективна лишь частично, в том числе, из-за затрудненного проникновения положительно заряженных реактиваторов через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), что приводит к невозможности предотвратить наблюдаемую у пострадавших нейродегенерацию.

Новые незаряженные конъюгаты производного урацила - 3,6-диметилурацила с 1,2,4-триазольным фрагментом, несущим гидроксикарбамойльную функцию будут способны реактивировать ингибированную параоксоном ацетилхолинэстеразу (АХЭ) человека и оказывать нейропротекторный эффект.

Исследование кинетики реактивации АХЭ *in vitro* с использованием параоксона в качестве модельного ФОС показало, что константа скорости реактивации (kg) для соединения-лидера 1b оказалась сопоставима с kg для прапидоксима (2-ПАМ) и составила $0,11 \pm 0,03$ мин⁻¹. При этом, в отличие от 2-ПАМ, соединение 1b оказалось способным на 25% реактивировать заингибированную параоксоном АХЭ головного мозга крыс. В модели нейротоксичности *in vivo*, вызванной параоксоном, было показано снижение степени нарушения когнитивных функций и гибели нейронов при совместной терапии 1b и 2-ПАМ. Так, в водном лабиринте Морриса крысы, получавшие совместную терапию 2-ПАМ и 1b не отличались по количеству пересечений области скрытой платформы от контрольной группы, в отличие от группы, реактиватором в которой выступил только 2-ПАМ. Последующее окрашивание апоптотических клеток головного мозга крыс, получавших 2-ПАМ совместно с 1b не выявило нейродегенеративных изменений в области зубчатой извилины гиппокампа, в отличие от группы, получавшей только 2-ПАМ.

Таким образом, незаряженные конъюгаты 6-метилурацила являются одними из немногих соединений, демонстрирующих нейропротекторную активность *in vivo*, а их применение в сочетании с заряженными оксимами является перспективным подходом для комплексной терапии отравлений ФОС. *Работа поддержана грантом РФФИ № 19-15-00344-П.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СЕЛЕКТИВНЫХ АНТАГОНИСТОВ М1 И М2 ПОДТИПОВ МУСКАРИНОВЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ В КАЧЕСТВЕ АНТИДОТОВ ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ ИНГИБИТОРАМИ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

К.А. Петров, О.А. Ленина ИОФХ им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, Казань

Отравление фосфорорганическими пестицидами, большинство из которых представляют собой ингибиторы ферментов ацетил- и бутирилхолинэстеразы ежегодно является причиной смерти нескольких сотен тысяч человек. Причиной смертельных исходов является нарушение работы дыхательной мускулатуры. В настоящее время основным антидотом, применяемым при неотложной терапии отравлений фосфорорганическими ингибиторами (ФОИ), является антагонист мускариновых ацетилхолиновых рецепторов (мАХР) атропин. Важно отметить, что семейство мАХР включает пять подтипов (М1-М5) и атропин не избирателен в отношении блокады какого-либо из подтипов мАХР. В то же время известно, что активация разных подтипов мАХР разнонаправленно модулирует уровень секреции ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах. Так, в нервно-мышечном соединении позвоночных активация М2 подтипа мАХР ингибирует, а активация М1 подтипа - стимулирует секрецию ацетилхолина (Oliveira et al., 2009). Мы попытались изучить возможность замены атропина при терапии отравлений ФОИ на избирательный антагонист М2 подтипа мАХР. Нами было показано, что в условиях *ex vivo* эффект модельного ФОИ параоксона на силу сокращения диафрагмальной мышцы мыши, регистрируемых на фоне преинкубации в растворе, содержащем атропин или метоктрамин статистически достоверно различался. Так, на фоне атропина эффект параоксона реализовывался в полной мере, сила сокращений снижалась до $32 \pm 2\%$ от контрольных значений. Однако на фоне преинкубации в растворе метоктрамина параоксон вызывал падение силы сокращений только до уровня $69 \pm 3\%$ от контрольных значений. Таким образом, метоктрамин способен в значительной степени предотвращать падение силы сокращений дыхательной мышцы, вызываемого ФОИ.

Кроме того, токсикологические эксперименты *in vivo* показали, что эффективная в качестве средства терапии отравлений параоксоном доза метоктрамина (10 мкмоль/кг) ниже, чем равная по эффективности доза атропина (33 мкмоль/кг). Таким образом, результаты данного токсикологического эксперимента позволяют говорить о том, что избирательная блокада М2 подтипа мАХР возможно будет более эффективна при терапии отравлений ФОИ чем блокада всех подтипов мАХР.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-15-00344-П.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ КЛЕТКИ. РЕЦЕПТОРЫ, ИОННЫЕ КАНАЛЫ И СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ СЕРТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ 1В- И 2В-ТИПА В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПУПЛОЧНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА

П.В. Авдонин¹, П.П. Авдонин¹, Е.Ю. Рыбакова¹, С.К. Труфанов¹, Н.В. Гончаров^{2,3}

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва; ²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург; ³НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Ленинградская обл., г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово

В эндотелиальных клетках (ЭК) экспрессируются серотониновые рецепторы 1В- и 2В-типа (5HT_{1B}R и 5HT_{2B}R), однако их функции и молекулярные механизмы действия остаются малоизученными. В докладе будут приведены результаты исследований авторов, касающихся участия 5HT_{1B}R и 5HT_{2B}R в регуляции обмен ионов кальция и активных форм кислорода в ЭК из пупочной вены человека и в реализации физиологических функций ЭК. Установлено, что характер действия агонистов 5HT_{1B}R и 5HT_{2B}R на уровень цитоплазматической концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в ЭК существенно отличается от действия агонистов других рецепторов, осуществляющих кальциевую сигнализацию (гистамина, вазопрессина, тромбина) по кинетике и по способам регуляции. Прирост $[Ca^{2+}]_i$ в ЭК в ответ на агонисты 5HT_{1B}R и 5HT_{2B}R происходит с заметной лаг-фазой, тогда как гистамин и агонисты других рецепторов активируют подъём $[Ca^{2+}]_i$ практически моментально. Добавленный извне пероксид водорода в физиологически релевантных концентрациях потенцирует ответ ЭК на 5HT_{1B}R и 5HT_{2B}R, но не влияет на подъём $[Ca^{2+}]_i$ или даже ингибирует его в случае гистамина. Наши данные свидетельствуют о том, что рецепторы 5HT_{1B}R и 5HT_{2B}R находятся в латентном состоянии, а добавление пероксида способствует их переходу в активное состояние. Мы обнаружили, что при одновременной активации 5HT_{1B}R и 5HT_{2B}R происходит не аддитивное, а синергичное усиление кальциевого ответа ЭК. Анализ Са-сигналов в одиночных клетках показал, что при совместном действии агонистов этих рецепторов происходит увеличение количества реагирующих клеток без изменения параметров кальциевых осцилляций. С помощью химических зондов и сенсорного белка HyPER установлено, что 5HT_{2B}R в ЭК сопряжены с системой генерации пероксида водорода. Предполагается, что образующийся эндогенный H₂O₂ по механизму положительной обратной связи усиливает кальциевый сигнал ЭК в ответ на активацию 5HT_{2B}R, а также активацию 5HT_{1B}R. Была исследована роль серотониновых рецепторов в реализации физиологических функций ЭК и было показано, что агонисты 5HT_{1B}R и 5HT_{2B}R стимулируют экзоцитоз фактора Виллебранда. Это свидетельствует о патогенетической роли данных рецепторов в развитии тромбозов микрососудов.

Исследования выполнялись при поддержке Российского научного фонда (грант №21-15-00441).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА БАРЬЕРНУЮ ФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ *IN VITRO*

П.А. Ковалева¹, А.С. Шахов², А.С. Таран², И.Б. Алиева²

¹Биологический факультет и ²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. Ломоносова, Москва

Частым осложнением при лечении онкозаболеваний является отек легкого и острая дыхательная недостаточность, возникающие вследствие дисфункции эндотелия сосудов. В зависимости от вида опухоли используют вещества с различным механизмом действия, результаты клинических наблюдений позволяют заключить - реакция сосудов зависит от используемого типа лекарственных средств и их дозы. Целью работы было изучение реакции эндотелиального монослоя на действие современных противоопухолевых препаратов *in vitro* и исследование сопутствующих внутриклеточных нарушений. Для работы использовали монослой эндотелиальных клеток EA.hy926. Определяли жизнеспособность эндотелиоцитов в интервале эффективных доз противоопухолевых препаратов, выбранных в экспериментах по подавлению пролиферации клеток наиболее распространенных типов опухолей: (HeLa (рак шейки матки), MCF7 и/или 4T1 (рак молочной железы), CT26 (рак толстой кишки), B16 (меланома), 22rv1 (рак простаты). Результаты показали, что при использовании нокадазола, таксола и винбластина жизнеспособность клеток эндотелия резко снижается при применении минимальных доз препаратов и далее не меняется при их повышении. При использовании доксорубина и винкристина жизнеспособность снижается постепенно и наблюдается доз-зависимый эффект воздействия. Был определен диапазон действующих концентраций противоопухолевых препаратов, в котором жизнеспособность клеток EA.hy926 не снижалась значимо. Для анализа и количественной оценки изменений, происходящих в строении цитоскелета эндотелиоцитов EA.hy926, использовали метод двойного иммунофлуоресцентного мечения клеток антителами к соответствующим цитоскелетным белкам. С помощью 3D-SIM-микроскопии исследовали и описали внутриклеточные эффекты воздействия выбранных доз препаратов, в том числе, на организацию и строение системы микротрубочек и актиновых компонентов цитоскелета. Оказалось, что возможно экспериментально подобрать концентрации противоопухолевых препаратов, подавляющие пролиферацию клеток выбранных опухолевых линий, но не влияющие на клетки эндотелия. Использование более высоких концентраций препаратов способно вызывать нарушение целостности эндотелиального монослоя, при этом наблюдаются характерные для барьерной дисфункции изменения цитоскелета.

Поддержано грантом РФФ 22-25-00663.

ПРИОБРЕТЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ ПРИ ИХ СОКУЛЬТИВАЦИИ С ИММУННЫМ КОМПОНЕНТОМ МИКРООКРУЖЕНИЯ

Н.Е. Кокорева, А.Д. Никитина, С.А. Владимирова, Б.А. Маргулис, И.В. Гужова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Различные факторы, выделяемые в микроокружение, запускают в раковых клетках защитные механизмы, благодаря которым может снижаться чувствительность клеток к химиотерапевтическим препаратам. К основным защитным механизмам клетки относится система белков-шаперонов. Показано, что во многих опухолях шапероны синтезируются на высоком уровне, что позволяет им эффективно противостоять апоптотическим стимулам в ходе применения препаратов первой линии химиотерапии. Синтез шаперонов осуществляется благодаря транскрипционному фактору HSF1. Целью данной работы послужило изучение влияния иммунного микроокружения опухоли на приобретение резистентности раковыми клетками через шаперонный аппарат клетки и главный транскрипционный фактор белков теплового шока – HSF1. В качестве клеточных моделей были выбраны линии клеток HCC6, HCC7 HCC9, полученные из опухолей пациентов с колоректальным раком, а также клетки HeLa с геном-репортером, кодирующим люциферазу, находящимся под контролем промотора, содержащего HSE. Моделью иммунного микроокружения нами были выбраны моноциты линии THP1. Результаты иммуноблоттинга показали, что для всех клеточных линий характерно повышение уровня HSF1, pHSF1 (Ser326), и некоторых белков теплового шока после сокультивации с моноцитами линии THP1. С помощью метода конфокальной микроскопии мы продемонстрировали, что помимо увеличения pHSF1 (Ser326) происходит его транслокация в ядро, что может свидетельствовать об активности HSF1 как транскрипционного фактора. Люциферазный репортерный тест показал, что при сокультивации клеток HeLa-luc с моноцитами THP1 в них повышается активность люциферазы, что свидетельствует об активации элементов теплового шока. На приборе xCELLigence мы показали, что в линиях колоректального рака HCC6, HCC7, HCC9 задерживается клеточная гибель от препарата хлорокина при их сокультивации с моноцитами THP1. Таким образом, в результате сокультивации с моноцитами THP1 в клетках колоректального рака повышается синтез и функциональная активность HSF1, что может приводить к активации шаперонной системы и повышению резистентности клеток колоректального рака к противоопухолевым препаратам.

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНДОГЕННЫХ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ HEK293

Д.О. Колесников, А.В. Перевозникова, К.О. Гусев, Л.Н. Глушканкова, Е.В. Казначеева, А.В. Шалыгин

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Ионы кальция регулируют множество внутриклеточных процессов во всех живых организмах. Основным источником кальция в электроневоозбудимых клетках является депо-управляемый вход, опосредованный каналами Orai и TRPC. Вход кальция через депо-управляемые каналы участвует как в регуляции различных внутриклеточных сигнальных каскадов, так и в регуляции активности различных кальций-зависимых ионных каналов. Мы показали, что при активации депо-управляемых каналов в клетках HEK293 активируются эндогенные кальций-зависимые каналы. Используя хелаторы кальция ВАРТА и EGTA, мы показали, что расстояние между депо-управляемыми и кальций-зависимыми каналами не превышает 20 нм. Вольт-амперные характеристики описанных нами каналов соответствовали свойствам кальций-зависимых хлорных каналов (CaCC) семейства ANO. Описанные нами каналы активировались приложением ионов кальция к внутриклеточной стороне мембраны, были селективны по отношению к хлорид-ионам, их активность подавлялась приложением неселективных (нифлумовой кислотой и ДИДС) и селективных (CaCCinh AO1) ингибиторов кальций-зависимых хлорных каналов. Таким образом, мы описали в клетках HEK293 сопряжение активаций эндогенных депо-управляемых каналов и каналов CaCC. Изучая свойства эндогенных каналов CaCC на уровне токов через отдельные каналы, мы изучили механизмы подавления и увеличения активности каналов CaCC. Нами было показано, что подавления активности каналов CaCC хелатором кальция ВАРТА и селективным ингибитором CaCCinhAO1 связано как с уменьшением вероятности открытого состояния каналов, так и с уменьшением времени открытого состояния каналов. Известно, что при повышении потенциала на мембране увеличивается ток через каналы CaCC. Мы показали, что это связано как с увеличением вероятности открытого состояния, так и проводимости эндогенных каналов CaCC. Таким образом, наши данные расширяют представление о регуляции эндогенных каналов CaCC.

МОНИТОРИНГ АКТИВНОСТИ PI3-КИНАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО СЕНСОРА

П.Д. Котова

Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН

Невозбудимые клетки способны отвечать на агонисты GPCR-рецепторов мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} , опосредованной работой фосфоинозитидного каскада. Эффективность фосфоинозитидного каскада модулируется рядом киназ, включая фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), продуцирующую фосфолипид PIP3.

Ранее нами было показано, что ингибитор PI3K вортманнин не влияет на способность клеток HEK-293 генерировать Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин, тогда как ингибитор PI3K другой химической природы PI828 полностью подавляет эти ответы. Для выяснения роли PI3K в генерации Ca^{2+} -ответов на ацетилхолин нами была получена моноклональная линия клеток HEK-293, экспрессирующих два генетически кодируемых сенсора, а именно сенсор цитозольного Ca^{2+} (R-GECO1) и сенсор PIP3 (PH(Akt)-Venus). Клетки этой линии позволяли одновременно регистрировать Ca^{2+} -сигналы и проводить мониторинг активности PI3K. Характерной особенностью R-GECO1 является увеличение интенсивности флуоресценции при повышении концентрации цитозольного Ca^{2+} , в то время как PH(Akt)-Venus при PI3K-зависимой генерации PIP3 в плазмалемме перераспределяется из цитозоля к мембране клетки. Оказалось, что ацетилхолин инициировал кратковременное повышение внутриклеточного Ca^{2+} , но не влиял на распределение PIP3-сенсора в цитоплазме клеток, что указывало на отсутствие ацетилхолин-

зависимой активации PI3K. В то же время инсулин, стимулирующий PI3K при участии тирозин-киназных рецепторов, вызывал перераспределение молекул PH(Akt)-Venus из цитозоля в мембрану клеток, что демонстрировало инсулин-индуцированную активность PI3K. Этот феномен не наблюдался в присутствии вортманнина или PI828, что свидетельствовало об эффективном подавлении активности PI3K этими соединениями.

Таким образом, стимулируя внутриклеточную Ca^{2+} -сигнализацию в клетках НЕК-293, ацетилхолин не инициировал активацию PI3K-пути, который, следовательно, не был вовлечен в холинергическую трансдукцию. При этом полученные данные свидетельствуют о том, что оба соединения вортманнин и PI828 являются эффективными ингибиторами активности PI3K. Однако, PI828 помимо ингибирования PI3K обладает неспецифическим действием на какую-то иную клеточную мишень, в результате которого подавляет ацетилхолин-индуцируемую Ca^{2+} -сигнализацию.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-75-10068.

КЛЕТОЧНЫЙ СЕНСОР С ГРАДУАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ К СЕРТОНИНУ

А.П. Черкашин, О.А. Рогачевская, С.С. Колесников

Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН

Одним из нейромедиаторов, высвобождаемых клетками, является серотонин. Для изучения секреции серотонина отдельными клетками необходим инструмент, способный детектировать наномолярные концентрации серотонина. Таким инструментом может служить клеточный биосенсор, представляющий собой клетки, экспрессирующие рецептор серотонина. При этом необходимо, чтобы рецептор был сопряжен с какой-либо сигнальной системой, для которой возможно проведение динамического мониторинга.

Ранее нами был создан сенсор серотонина на основе клеток линии СНО и серотонинового рецептора 5-HT_{2C}, сопряженного с кальциевой сигнализацией. Клетки СНО/5-HT_{2C} реагировали на появление 1 – 3 нМ серотонина повышением уровня внутриклеточного Ca^{2+} , который визуализировали с использованием флуоресцентных Ca^{2+} -зондов. Полученные клеточные сенсоры были способны многократно отвечать на стимуляцию серотонином, однако амплитуда их ответов не зависела от его концентрации. То есть проводить исследования, связанные с величиной выброса серотонина, с помощью данного сенсора не представлялось возможным.

В связи с этим мы поставили задачу создания клеточного сенсора, амплитуда ответов которого будет зависеть от концентрации серотонина градуально. сАМР-сигнализация, в отличие от кальциевой, не включает в себя триггерных механизмов, поэтому можно было ожидать, что в случае использования рецептора, сопряженного с аденилатциклазным каскадом, серотонин будет вызывать в клетках сАМР-ответы, амплитуда которых будет зависеть от дозы агониста. Динамический мониторинг уровня сАМР в клетке стал возможен с появлением генетически кодируемого флуоресцентного сАМР-сенсора Pink Flamindo. Полагаясь на перечисленное, мы создали биосенсор на основе клеток НЕК-293, сАМР-сенсора Pink Flamindo и рецептора серотонина 5-HT₄. Полученные клетки демонстрировали увеличение интенсивности флуоресценции Pink Flamindo в ответ на появление в растворе 2 нМ серотонина, при этом в диапазоне концентраций 2 – 20 нМ амплитуды сАМР-ответов обладали выраженной зависимостью от концентрации серотонина. Таким образом, созданный клеточный сенсор дает возможность не только детектировать сам факт выброса серотонина из одиночной клетки, но и позволяет судить об изменении величины такого выброса. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-75-10068.*

СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗНЫХ ДОЗИРОВОК НОВОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО АГЕНТА КАМФЕЦИНА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕЧЕНИ КРЫС

О.П. Сальников^{1,2}, А.В. Фатьянова¹, О.И. Яровая²

¹Новосибирский государственный университет; ²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

Несмотря на пандемию Covid-19, опасность распространения вируса гриппа А (IVA) и риск заражения несколькими вирусами остаются актуальными [Grech, Borg, 2020]. К существующим противовирусным средствам, включающим блокаторы протонного канала M2 (производные адамантана), ингибиторы нейраминидазы и ингибиторы RdRp, быстро возникает вирусная резистентность [Ison, 2015]. Активно продолжается поиск новых противовирусных средств. Одним из таких средств может стать иминопроизводное камфоры камфецин ((+)-1,7,7-триметилбицикло (2.2.1) гептан-2-илиден-аминоэтанол). Он синтезирован в НИОХ СО РАН, обладает высокой противовирусной активностью в малых дозах за счет ингибирования активности гемагглютинина и низкой токсичностью [Яровая ОИ и др. 2013, Рогачев 2018]. Целью работы явилось выявление некоторых биохимических эффектов камфецина при введении в разных дозировках, показавших противогриппозную активность *in vitro*. Работа выполнена на половозрелых крысах линии WAG с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Введение лекарственных агентов осуществляли внутрижелудочно в течение 5 суток: контрольные животные (1 мл 0,9% NaCl), камфецин (10, 15, 20 и 25 мг/кг массы), римантадин (100 мг/кг массы). Проведен биохимический анализ показателей печени: активности АЛТ, АСТ и ГГТ, определена концентрация глюкозы в крови. Выявлено, что наиболее физиологичными для млекопитающих дозировками камфецина являются 10 и 15 мг/кг массы. Для дозировки в 10 мг/кг это выражено в достоверном снижении активности АЛТ по сравнению с группами введения 20 и 25 мг/кг ($p < 0,01$ для обеих групп), уменьшении активности АСТ по сравнению с группами введения камфецина 20 и 25 мг/кг ($p < 0,001$ для 20 мг/кг и $p < 0,05$ для 25 мг/кг), уменьшении активности ГГТ в сравнении с группами введения камфецина 25 мг/кг ($p < 0,05$ и римантадина ($p < 0,01$)) и снижения концентрации глюкозы при сравнении с группами введения 20 и 25 мг/кг камфецина ($p < 0,01$ – для обеих групп). Для группы введения камфецина в дозировке 15 мг/кг наблюдается достоверно пониженная активность ГГТ по сравнению с группой римантадина ($p < 0,01$). При рассмотрении активности АЛТ, АСТ и концентрации глюкозы достоверных изменений в сравнении с группами введения камфецина 20, 25 мг/кг и римантадина не обнаружено.

ФИЗИОЛОГИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ У КРЫС И МЕХАНИЗМЫ ИХ ДИНАМИЧЕСКИХ СДВИГОВ В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОГО БОЛЕВОГО ПРОЦЕССА

М.В. Гулян, Б.Г. Антонян

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

В связи с распространенностью хронической боли актуальным становится изучение количественных и качественных соотношений регуляции цитокинов при хроническом болевом синдроме (ХБС), влияющих на последующую выработку противовоспалительной терапии. Цель исследования: изучить динамику уровня цитокинов и возможные механизмы их сдвигов в процессе развития ХБС. Исследование проведено на крысах, разделенных на 7 групп по 10 в каждой: одну контрольную и 6 опытных с воспроизведенной экспериментальной моделью болевого синдрома путем ежедневной 2-х кратной двухминутной чрезкожной электростимуляции рецепторной зоны корня хвоста. Концентрацию цитокинов (ИЛ-1 β ; ИЛ-4; ИЛ-6; ФНО- α) в сыворотке крови крыс определяли иммуноферментным методом. Статистическая обработка и оценка данных проводилась с использованием программы MS Excel. На начальных стадиях ХБС цитокиновый профиль крови крыс отклоняется в сторону увеличения провоспалительного компонента, но в последующем изменяется в направлении усиления противовоспалительной активности. Анализируя механизмы изменения уровня цитокинов, можно полагать, что они включают каскадный тип активации рабочих комплексов сети; межкомпонентные взаимодействия с синергичными и реципрокными эффектами; ауторегуляторные реакции самоиндукции и самоингибирования. На каскадный механизм усиления цитокиновой реакции указывает инициальный рост концентрации ИЛ-1 β и отсроченный ответ остальных фракций после первой болевой стимуляции. До периода хронизации процесса усиливалась активность провоспалительных цитокинов (ИЛ-6), что, вероятно, обеспечивалось синергичными потенцирующими эффектами других цитокинов (ИЛ-1 β ; ФНО- α и др.) и его самоиндукцией. Реципрокные взаимодействия выявляются в поэтапных контрфазовых колебаниях концентрации ИЛ-1 β и ИЛ-4 – увеличение первого сопровождалось снижением второго, и наоборот. Механизм аутокринной регуляции цитокинов реализуется по типу по типу положительной (самоиндукция ИЛ-6 на ранних стадиях процесса) и отрицательной обратной связи (самоингибирования в хронической фазе).

В ходе исследования было выявлено, что развитие хронического аллогенного процесса у крыс сопровождалось неоднородной динамикой различных цитокиновых фракций крови как по времени развертывания реакции, так и по ее направленности и интенсивности.

НЕКОНТРОЛИРУЕМОЕ ТЕЧЕНИЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ В ГЕСТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ КАК ПРЕДИКТОР ПЕРИНАТАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ

О.Б. Приходько, Е.Б. Романцова, Т.А. Лучникова, Ю.В. Сулова, Е.И. Смородина

Амурская государственная медицинская академия МЗ РФ, Благовещенск

Целью работы было определение особенностей клинко-функционального течения бронхиальной астмы (БА) в гестационном периоде, влияния неконтролируемого течения заболевания на развитие осложнений беременности, родов и состояние плода и новорожденного.

Среди беременных выделены следующие группы: с контролируемой БА (I группа, 85 пациенток), с частично контролируемой (II группа, 78 больных), с неконтролируемой БА (III группа 90 больных) (критерии GINA), группа сравнения - 30 беременных без бронхолегочной патологии (IV группа). Выявлено, что у больных БА с нарушениями вентиляционной функции легких по данным спирометрии и пикфлоуметрии возрастала частота осложнений беременности. По сравнению с I группой, у пациенток III группы чаще развивался гестоз (в 1,9 раза), хроническая плацентарная недостаточность (в 1,7 раза), хроническая внутриутробная гипоксия плода (в 1,5 раза), инфекция амниотической полости и плодных оболочек (в 1,4 раза), что свидетельствовало об ухудшении условий для внутриутробного развития плода при наличии вентиляционных нарушений у беременных и отсутствии контроля заболевания. При этом в III группе в 2,3 раза чаще наблюдались новорожденные с оценкой по шкале Апгар ниже 6 баллов, чем в I – II группах ($p < 0,05$). У детей от матерей II-III групп чаще ($p < 0,001$) отмечались церебральная ишемия, синдром задержки внутриутробного развития плода (ЗВРП) ($p < 0,01$), гипотрофия II-III степени, постгипоксическая кардиопатия, синдром дыхательных расстройств (СДР) ($p < 0,05$), токсическая эритема. Выявленные патологические состояния отрицательно влияли на дальнейшее развитие детей, приводя к повышенной заболеваемости в период новорожденности. Прямо пропорционально степени вентиляционных нарушений нарастала частота дисгармоничного развития плода и новорожденного ($p < 0,001$) за счет снижения массо-ростовых показателей. Неконтролируемое течение БА приводило к достоверному учащению таких тяжелых заболеваний, как церебральная ишемия, СДР, ЗВРП, отрицательно влияющих не только на развитие плода и новорожденного, но и на состояние здоровья детей в последующие периоды.

Отсутствие контроля БА во время беременности сопровождается увеличением полиорганной патологии у новорожденных, значительным снижением рождения здоровых детей, ранним развитием у них аллергических заболеваний.

КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ ТЯЖЕЛОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У БЕРЕМЕННЫХ

О.Б. Приходько, Е.Б. Романцова, Т.А. Лучникова, И.В. Кострова

Амурская государственная медицинская академия МЗ РФ, Благовещенск

Проанализированы клинко-функциональные особенности течения, исходы беременности, родов и состояние новорожденных у 42 пациенток с тяжелой бронхиальной астмой (БА). Группу сравнения составили 50 беременных без аллергических заболеваний. Используются клинко-anamnestические данные, интегральный мониторинг клинических синдромов, тестиро-

вание с помощью Теста по контролю над астмой (АСТTM), исследование вентиляционной функции легких с изучением обратимости бронхиальной обструкции, суточный мониторинг показателей бронхиальной проходимости.

У 19 (45,2%) больных диагностирована аллергическая форма БА, у 7 (16,7%) – неаллергическая, у 16 (38,1%) – смешанная. ОРВИ во время беременности наблюдались у 38 (90,5%) пациенток, чаще встречаясь во II и III триместрах беременности. У 4 пациенток симптомы БА впервые манифестировали при сроке беременности 12-14 и 20-22 недели на фоне ОРВИ. Внегочные заболевания атопического круга наблюдались у 36 (85,7%) пациенток: аллергический ринит – у 34 (81%) больных, поллиноз – у 27 (64,3%), крапивница – у 8 (19%), атопический дерматит – у 3 (7,1%). Обострение БА на протяжении одного триместра беременности было у 15 (35,7%) больных. Обострения заболевания прослеживались в течение двух триместров: в I и III – у 6 (14,3%) беременных, во II и III – у 16 (38,1%), в 7 (16,7%) случаях имелось неконтролируемое течение БА на протяжении всей беременности. У 4 (9,5%) больных развился астматический статус при сроке гестации 35 – 37 недель. В целом, течение БА у 12 (28,5%) пациенток в гестационном периоде осталось без существенной динамики, у 30 (71,4%) – утяжеление симптомов. Отмечена высокая частота гестационных осложнений у больных БА, превышающая показатели группы сравнения в 2-3 раза (ранний токсикоз, угроза прерывания, гестоз, хроническая внутриутробная гипоксия плода, хроническая фетоплацентарная недостаточность, преждевременные роды, кесарево сечение) ($p < 0,01$). Средняя масса тела новорожденных от матерей с БА составила 2863 ± 150 г, в группе сравнения – 3530 ± 110 г ($p < 0,05$).

В структуре выявленной патологии новорожденных ведущие места занимали: церебральная ишемия, внутриутробное инфицирование, нарушение периода адаптации, синдром дыхательных расстройств, при этом уровень патологии значительно выше у детей от матерей с БА ($p < 0,05$).

СТЕРОИДОГЕННЫЕ И СПЕРМАТОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ МЕТФОРМИНА И ЕГО КОМБИНАЦИЙ С АГОНИСТАМИ РЕЦЕПТОРА ЛУТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА У КРЫС С ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

И.А. Лебедев, К.В. Деркач, А.А. Бахтюков, А.М. Степочкина, Л.В. Баюнова, В.Н. Сорокоумов, А.О. Шпаков
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Метформин (МФ) – препарат первой линии выбора при лечении сахарного диабета 2 типа (СД2). В основе его антидиабетического эффекта лежит повышение чувствительности тканей к инсулину, восстановление углеводного и липидного обмена и энергетического статуса клеток-мишеней. В последние годы появились данные, что МФ улучшает функции мужской и женской репродуктивных систем при метаболических расстройствах, в том числе при СД2. Однако механизмы этого не исследованы, не изучено совместное влияние МФ и других активаторов гонадной оси на мужскую репродукцию. Целью работы было изучить эффекты длительной терапии МФ самцов крыс с СД2 на тестикулярный стероидогенез и сперматогенез, а также оценить влияние МФ на стероидогенные эффекты хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) и низкомолекулярного агониста рецептора лутеинизирующего гормона (ЛГР) – ТПО3. СД2 вызывали высокожировой диетой и однократной обработкой крыс низкой дозой стрептозотоцина. Обработку МФ проводили в течение 5 недель (120 мг/кг/сутки), ХГЧ (15 МЕ/крысу) и ТПО3 (15 мг/кг) вводили однократно или в течение 5 дней в конце лечения МФ. МФ нормализовал уровень тестостерона и эстрадиола в крови и семенниках диабетических крыс, улучшал экспрессию тестикулярных стероидогенных генов, восстанавливал экспрессию ЛГР и показатели сперматогенеза. У диабетических крыс ХГЧ и ТПО3 повышали уровень тестостерона и экспрессию гена холестерин-транспортирующего белка StAR в семенниках. Однако стимулирующий эффект ХГЧ (но не ТПО3) был ниже, чем в контрольной группе. В отличие от ТПО3, после 5 дней введения ХГЧ снижал экспрессию ЛГР в семенниках. Стероидогенные эффекты ХГЧ и ТПО3 при их однократном введении МФ-обработанным СД2-крысам усиливались, в то время как при пятидневном введении они ослаблялись на фоне восстанавливающего эффекта МФ. Это связано со снижением экспрессии ЛГР и повышением тестикулярного уровня эстрадиола, синтезируемого ароматазой. В отличие от контрольных крыс, ХГЧ и ТПО3 не вызывали улучшения показателей сперматогенеза у леченных МФ СД2-крыс. Таким образом, МФ восстанавливает стероидогенез и сперматогенез при СД2, а также повышает чувствительность семенников к агонистам ЛГР при их однократном (но не при длительном) введении.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-75-20122).

ЗАЩИТНОЕ ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ СПИННОГО МОЗГА НА СЛИЗИстую ОБОЛОЧКУ ЖЕЛУДКА ПРИ УЛЬЦЕРОГЕННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ: РОЛЬ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Д.С. Сахно, Т.Р. Мошонкина, Ю.П. Герасименко, Л.П. Филаретова
Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Цель работы состояла в исследовании влияния электростимуляции спинного мозга на чувствительность слизистой оболочки желудка крыс к ulcerогенным воздействиям и выяснении роли глюкокортикоидных гормонов в реализации этого влияния. Для спинальной стимуляции использовали проволочные электроды из нержавеющей стали (AS632; Cooner Wire, Chatsworth, Калифорния, США), которые подшивали к твердой мозговой оболочке на задней поверхности спинного мозга по средней линии на уровне нижнегрудного (между T11–12 позвонками) и поясничного (между L1–L2 позвонками) отделов позвоночника. Электроды для регистрации двигательных ответов на стимуляцию также подшивали к мышцам задних конечностей. Одиночными импульсами осуществляли подбор интенсивности тока до достижения регистрируемого двигательного ответа мышц, который принимали за пороговую интенсивность. Стимуляцию спинного мозга наркотизированных животных проводили подпороговым током (80% от порогового) с целью исключения влияния движений (20 мин). Для электрической стимуляции спинного мозга использовался стимулятор А-М System, Model 2100, монополярные импульсы прямоугольной формы длительностью 1 мс, амплитудой 350–700 мкА с частотой 30 Гц. В ходе проведенных исследований выявлено, что спинальная стимуляция вызывает активацию гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы, проявляющуюся в увеличении уровня глюкокортикоидных гормонов в крови, и оказывает гастропротективное влияние при ulcerогенном

действию ишемий-реперфузии желудка. Для оценки вклада глюкокортикоидных гормонов в гастропротективный эффект электростимуляции спинного мозга использовали ингибитор синтеза глюкокортикоидных гормонов метирапон (30 мг/кг). Введение метирапона предотвращало повышение уровня кортикостерона в крови в ответ на стимуляцию и устраняло гастропротективный эффект. Полученные результаты свидетельствуют о защитном влиянии электростимуляции спинного мозга на слизистую оболочку желудка при язвенно-генном воздействии и вовлечении глюкокортикоидных гормонов в реализацию этого гастропротективного влияния.

Исследование поддержано грантом НЦМУ (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020) Павловский центр «Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости».

НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СОЕДИНЕНИЯ ALPELISIB

Е.А. Дымова, П.Д. Котова

Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН

Многие GPCR-рецепторы сопряжены с кальциевой (Ca^{2+}) сигнализацией, которая является регулятором важнейших клеточных функций от экспрессии генов до апоптоза. Внутриклеточная Ca^{2+} -сигнализация регулируется при участии ряда ферментов, в том числе и PI3-киназы. Ранее нами было обнаружено, что ингибиторы PI3-киназы PI828 и LY294002 подавляют Ca^{2+} -сигналы, инициируемые агонистами аминергических GPCR-рецепторов. При этом полученные нами данные указывали на то, что блокирование Ca^{2+} -ответов связано не с ингибированием PI3-киназы, а скорее всего, опосредовано прямым воздействием этих соединений на рецепторы. В связи с этим представляет интерес, обладают ли подобными неспецифическими свойствами ингибиторы PI3-киназы, одобренные для использования в качестве противоопухолевых препаратов, например Alpelisib. В данной работе с помощью мониторинга внутриклеточного Ca^{2+} в одиночных клетках линии НЕК-293 исследовали влияние Alpelisib на Ca^{2+} -сигналы, инициируемые ацетилхолином. Стимуляция клеток ацетилхолином вызывала в них Ca^{2+} -ответы, которые блокировались в присутствии Alpelisib. Формально это можно интерпретировать как свидетельство участия PI3-киназы в генерации Ca^{2+} -ответов на ацетилхолин. Однако классический ингибитор PI3-киназы другой химической природы Wortmannin не влиял на способность клеток отвечать на ацетилхолин. То есть Alpelisib блокировал Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин не за счет ингибирования PI3-киназы. Обращал на себя внимание тот факт, что Alpelisib блокировал ответы при его одновременной аппликации с агонистом, тогда как обычно ингибирование внутриклеточных мишеней требует времени для проникновения ингибитора через плазматическую мембрану и его накопления в цитозоле. Тот факт, что Alpelisib блокировал клеточные ответы без предварительной инкубации с ним, указывал на возможность внеклеточного действия этого соединения, то есть в качестве вероятной мишени могли выступать сами мускариновые рецепторы.

Следует отметить, что Alpelisib обладает широким спектром побочных эффектов. Возможно, обнаруженная нами способность веществ этого класса неспецифическим образом подавлять холинергическую сигнализацию может лежать в основе некоторых из них. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-10068.*

АГОНИСТ-ИНДУЦИРОВАННАЯ Ca^{2+} -СИГНАЛИЗАЦИЯ. РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ IP_3 -РЕЦЕПТОРА

Е.Н. Кочкина, Е.Е. Копылова, М.Ф. Быстрова, С.С. Колесников

Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН

В генерации внутриклеточных Ca^{2+} -сигналов, индуцированных агонистами, ключевую роль играет выброс Ca^{2+} из депо при участии IP_3 -рецепторов (IP_3R). Последние являются IP_3 -активируемыми Ca^{2+} -каналами, локализованными в основном на мембране эндоплазматического ретикулума (ЭР, Ca^{2+} -депо). Три гена кодируют субъединицы IP_3R1 , IP_3R2 и IP_3R3 , обычно формирующие гомотетраммерные Ca^{2+} -каналы. Изоформы IP_3R характеризуются разной чувствительностью к IP_3 и Ca^{2+} и специфическими механизмами регуляции. Для исследования роли каждой изоформы в агонист-индуцированной Ca^{2+} -сигнализации, нами были последовательно инактивированы два из трех генов, кодирующих IP_3R изоформы, с использованием CRISPR/Cas9 технологии. Были получены клеточные моноклоны с единственной функциональной изоформой (IP_3R1 , IP_3R2 или IP_3R3) и был проведен функциональный анализ ацетилхолин (ACh)-индуцированных Ca^{2+} -сигналов с использованием микрофотометрии и флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fluo-4. Оказалось, что как и в случае клеток НЕК293 дикого типа (WT), в которых функциональны все три изоформы, клетки моноклонов генерировали Ca^{2+} -ответы на ACh по принципу «всё или ничего»: при концентрации ниже пороговой ответы не регистрировались, но при дозах выше пороговых Ca^{2+} -сигналы кинетически и по амплитуде были идентичны. Клетки WT и IP_3R2 обладали схожей чувствительностью к ACh (порог ~250нМ), тогда как клетки IP_3R1 и IP_3R3 демонстрировали пороги ~0,5 и 1 мкМ, соответственно. Лагпериоды ответов (время, необходимое для достижения половины максимального значения ответа) градуально уменьшались при увеличении концентрации агониста. В целом, ряд чувствительности модифицированных клеток соответствовал ряду аффинностей IP_3R изоформ к IP_3 : $IP_3R2 > IP_3R1 > IP_3R3$.

Метаболизм Ca^{2+} в ЭР определяется его закачкой Ca^{2+} -АТФазой SERCA и его выходом через IP_3R и ионные каналы ЭР. Для оценки вклада IP_3R в утечку Ca^{2+} из ЭР был проведен тапсигаргиновый тест. Оказалось, что в случае клеток IP_3R1 и IP_3R2 , скорость Ca^{2+} утечки из ЭР была значительно ниже по сравнению с клетками WT и IP_3R3 . Это может объясняться тем, что по сравнению с IP_3R1 и IP_3R2 , спонтанная активность IP_3R3 достаточно высока, и поэтому в покоящихся клетках эта изоформа может вносить вклад в утечку Ca^{2+} из ЭР. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-14-00031.*

ФИЗИОЛОГИЯ ПРОЦЕССОВ МОРФОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА КОСТНОЙ ТКАНИ В 2D- И 3D- МОДЕЛЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

К.А. Юрова¹, О.Г. Хазиахметова¹, В.В. Малащенко¹, И.К. Норкин¹, И.А. Хлусов^{1,2}, Л.С. Литвинова¹

¹Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград; ²Сибирский государственный медицинский университет, Томск

МСК регулируют процессы тканеобразования в организме. Для создания условий культивирования, близких к *in vivo*, важно учитывать пространственную организацию клеток. В настоящем исследовании проведен анализ формирования внеклеточного матрикса с применением 2D- и 3D-моделей культивирования. Материалом исследования служила культура МСК, выделенных из жировой ткани человека (ЛЭК № 1 от 22.03.2021 БФУ имени И. Канта). Для эксперимента использовали клетки с принадлежностью к МСК в соответствии с минимальными критериями Международного общества клеточной терапии. 3D-модель была создана добавлением в среду культивирования образцов имплантатов с кальцийфосфатным покрытием (Ra=2-3 мкм), изготовленных в ИФПМ СО РАН (Томск). Контролем служила 2D-модель культивирования на пластике. Культивирование МСК проводили при 37°C, 100% влажности, 5% содержании CO₂ в течение 21 суток. Для постановки эксперимента использовали ППС (5% FBS, 400 Е/мкг/мл пенициллин/стрептомицин, 2 мМ L-глутамин, αMEM). Оценку поверхностных маркеров CD105, CD73, CD90, CD45, CD14, CD20, CD34 осуществляли на 14 сутки на цитометре MACS Quant FL7 system (Miltenyi Biotec, Germany). После 21 дня культивирования проводили морфологическую оценку МСК, окрашивая культуры МСК 2% р-ром ализаринового красного S (Sigma-Aldrich, США). Цитологические препараты фотографировали в проходящем свете на микроскопе AxioScope 40 (Carl Zeiss, Jena, Germany), с увеличением 40–100, фотоаппарат Canon PowerShot G10 (Canon Inc., Япония) с разрешением 14,7 МП. Цитоморфометрическое исследование проводили на Adobe Photoshop CS6 (Adobe Inc., США). Статистический анализ был проведен с использованием IBM SPSS Statistics 20. Анализ результатов показал 2-кратное увеличение числа [CD45,34]⁺ после 14 суток культивирования в 3D-модели (p<0,05) с одновременным снижением МСК с фенотипом [CD73,90,105]⁺ относительно контроля. В 3D-модели культивирования детектировалось формирование участков минерализации на фоне увеличения числа кроветворных клеток (p<0,05) по сравнению с 2D-контролем. Таким образом, 3D-модель культивирования модулирует условия функционирования МСК, приближенные к реальным, позволяя оценивать процессы формирования костной ткани *in vitro*.

Работа выполнена в рамках Программы ПРИОРИТЕТ 2030 в БФУ им. И.Канта и СибГМУ.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ГАЗОРАЗРЯДНОЙ ПЛАЗМЫ НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ

Т.В. Руденко¹, В.П. Демкин¹, А.И. Курганникова¹, В.В. Удуг^{1,2}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет; ²НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ, Томск

Эритроциты – высокодифференцированные клетки, уникальность которых обеспечивается плазмолеммой, определяющей их агрегационную активность и деформируемость. Действительно, снижение деформируемости мембран эритроцитов и появление в их популяции патологических форм является одним из основополагающих факторов увеличения вязкости крови, что, в свою очередь, может выступить триггером как к поражению органов-мишеней, так и к развитию осложнений тромботического характера. Поэтому изучение состояния эритроцитарных мембран остается актуальным для целевой коррекции нарушений текучести крови в плане превенции гемореологических повреждений тканей. При начальных вариантах морфологической трансформации возможно восстановление эритроцитов из патологических форм в дискоциты. Как известно, клетки в форме двояковогнутого диска имеют высокое соотношение площади поверхности к объему $S/V=1,9$, что позволяет эритроциту увеличивать внутренний объем в гипоосмотических условиях почти в 2 раза без потери целостности мембраны. Таким образом, управление объемом клетки путем активации трансмембранных потоков осмотически активных частиц для восстановления осмотического баланса может служить основой коррекции формы эритроцитов. Одним из перспективных механизмов активации потенциала управляемых ионных каналов представляется воздействие электромагнитного излучения на клеточную мембрану. Механизмы и эффекты действия электромагнитного излучения на клетки и ткани достаточно хорошо изучены, а вот действие в отношении собственно мембраны клетки – изучено явно недостаточно. В связи с этим нами проведены экспериментальные и теоретические исследования влияния излучения неравновесной газоразрядной плазмы (нестационарный слаботочный плазмотрон) на эритроциты и их мембраны. Для понимания роли излучения плазмы в регулировании объема клетки нами разработана математическая модель эритроцита, описывающая изменение объема клетки, внутриклеточного содержания K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , воды и органических осмолитов за счет их трансмембранных переходов. Комплексирование математического моделирования и *in vitro* эксперименты по взаимодействию излучения плазмы с клеточными структурами позволят сформировать подходы к управлению морфо-функциональными свойствами эритроцитарных мембран.

РОЛЬ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ТРОМБОЦИТОВ В РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

И.П. Антропова, Е.А. Волокитина, С.М. Кутепов, Д.А. Челчушев

Уральский медицинский университет МЗ РФ, Екатеринбург

Проблема применения биологических материалов на основе тромбоцитов в последнее время вызывает беспрецедентное внимание в регенеративной медицине, поскольку эти клетки являются важнейшими участниками регенерации тканей организма. Вместе с тем результаты применения тромбоцитарных препаратов неоднозначны, что в значительной степени связано

с недостаточной изученностью роли морфо-функционального состояния тромбоцитов в процессе репаративного остеогенеза. Проведено изучение ремоделирования перимплантной костной ткани в зависимости от морфо-функциональных свойств тромбоцитов в эксперименте (кролики). Работа одобрена локальным этическим комитетом. При определении интегрального морфо-функционального потенциала тромбоцитарного звена гемостаза экспериментальных животных использовались показатели: количество тромбоцитов, средний объем клеток, тромбоцитрит, распределение по объему, процентное содержание крупных форм, агрегационная активность (индуктор АДФ). Проведенные экспериментальные исследования показали, что тромбоциты, имеющие более высокий морфо-функциональный потенциал стимулируют более активный процесс остеогенеза, о чем свидетельствует активность маркера остеогенеза остеокальцина. В то же время не обнаружено влияния морфо-функциональных свойств тромбоцитов на уровень воспаления, основные биохимические параметры, а также на основные показатели красной и белой крови экспериментальных животных при имплантации титанового стержня. При изучении механических свойств костной ткани после имплантации титанового стержня обнаружено, что морфофункциональные свойства тромбоцитов оказывают существенное влияние на прочностные характеристики, но не на эластичность кости. Доказано, что более высокий тромбоцитарный потенциал сопряжен с более высокой концентрацией кальция и большим значением отношения Са/P в перимплантной кости. В результате исследования было также показано, что количество тромбоцитов, объем клеток, агрегационная активность в послеоперационном периоде имеют зависимость от своих исходных параметров. Это предполагает возможность прогнозирования функциональной активности тромбоцитов и успешности репаративного процесса при проведении крупных ортопедических операций.

ПОТЕРЯ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ РЕГЕНЕРАЦИИ ВЫСШИМИ ПОЗВОНОЧНЫМИ КАК ПРИЧИНА ЭВОЛЮЦИОННОГО СНИЖЕНИЯ ИХ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ СПОСОБНОСТЕЙ. «УТРАЧЕННЫЙ ГЕН» *AG1* НЕОБХОДИМ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ У ГОЛОВАСТИКОВ *XENOPUS LAEVIS*

К.Р. Арасланова^{1,2}, А.С. Иванова^{1,3}, М.Б. Терёшина^{1,3}, Н.Ю. Мартынова^{1,3}, А.Г. Зарайский^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова; ³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. И.П. Пирогова, Москва

Эпиморфная регенерация свойственна многим видам низших позвоночных (Anamnia), но не наблюдается у высших (Amniota), в том числе у человека. Особый интерес представляет поиск уникальных регуляторов, которые позволяют Anamnia осуществлять полное восстановление утраченного органа. У тритона был обнаружен фактор Agr2, способный стимулировать регенерацию ампутированной конечности, а проведенный нами филогенетический анализ генов семейства Agr показал, что ортолог *agr2*, ген *ag1*, обнаруживается только у Anamnia, но отсутствует у Amniota. Также мы выявили, что экспрессия генов *ag1* и *agr2* резко активируется на ранних этапах регенерации у головастиков *X. laevis*. В итоге была выдвинута гипотеза о взаимосвязи между потерей генов-регуляторов регенерации в эволюции и тенденцией к снижению регенеративного потенциала Amniota. Соответственно, одним из таких утраченных генов-регуляторов может быть *ag1*. Исследование роли *ag1* в процессе регенерации у головастиков *X. laevis* показало, что при нокадауне этого гена путем инъекций морфолиноолигонуклеотидов происходит нарушение регенерации хвоста. Это проявляется в уменьшении длины регенератов, и сопровождается подавлением митотической активности клеток и пониженным уровнем экспрессии маркеров регенерации (*fgf20*, *msx1*, *wnt5a*) у опытных особей. Головастики *X. laevis* теряют способность к регенерации хвоста в особый рефрактерный период (РП) по естественным причинам, что делает их удобной моделью для исследования причин снижения регенеративных способностей и поиска способов ее восстановления. При проведении ампутации хвоста в РП экспрессия генов Agr оказывается значительно ниже, чем вне РП. Оверэкспрессия генов *Ag1/Agr2* в РП путем микроинъекций их мРНК или обработки экзогенными рекомбинантными белками приводила к восстановлению способности к регенерации хвоста, а наблюдаемые эффекты на клеточном и молекулярном уровне были обратными, чем таковые при нокадауне генов Agr. Результаты работы раскрывают потенциал исследований регенерации у низших позвоночных для выявления новых подходов к улучшению регенерации у человека и свидетельствуют в пользу гипотезы о потере генов-регуляторов как одной из причин снижения регенеративных способностей. Работа поддержана государственным заданием Минздрава РФ №200075056 и грантам РФФИ №20-04-00675.

НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПОСТСТРЕССОРНЫХ РАССТРОЙСТВ: ИССЛЕДОВАНИЕ НА ЛИНИЯХ КРЫС С КОНТРАСТНОЙ ВОЗБУДИМОСТЬЮ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

И.Г. Шалагинова¹, Н.А. Дюжикова²

¹Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград; ²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Стресс считается одним из факторов, который в сочетании с биологической уязвимостью может привести к проявлению депрессивных и тревожных расстройств. Однако точные механизмы их патогенеза не ясны. Хронический стресс приводит к развитию нейровоспаления, которое в настоящее время рассматривается как возможная причина нарушений клеточной пластичности, что приводит к дисфункциям в нервной ткани. Цель работы: оценка динамики постстрессорного периферического и нейровоспаления и выраженности нейродегенерации у линий крыс с контрастной возбудимостью нервной системы. Эксперименты проводились на взрослых самцах двух линий с высокой и низкой возбудимостью нервной системы. Производили подсчет клеток микроглии в гиппокампе (Iba1+), оценку соотношения нейтрофиловлимфоцитов в крови и определяли уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов в крови и головном мозге (rtPCR). Нейродегенерацию выявляли с использованием маркера Fluoro JadeB, а также оценивали уровень экспрессии гена *Bdnf* в мозге и крови животных. Стрессировали экспериментальных животных в соответствии с протоколом К. Гехта: каждый день в течение 15 дней животные подвергались воздействию 6 неподкрепляемых и 6 подкрепляемых током световых сигналов. Стрессированных и контрольных животных декапитировали в четыре временные точки: через 24 часа; 7 дней; 24 дня и 60 дней после стресса. Полученные

данные позволяют предположить, что возбудимость нервной системы является возможным фактором риска развития пост-стрессорных патологий. У высоковозбудимых животных наблюдается усиление тревожного поведения в ответ на длительный стресс, количество клеток микроглии увеличивается во всех изученных областях гиппокампа через 7 дней после стресса, в гиппокампе, миндалине и префронтальной коре наблюдалось увеличение экспрессии IL 1 β через 24 дня после стресса. Кроме того, постстрессорная нейродегенерация у возбудимых животных проявляется раньше, чем у низковозбудимых крыс. У линии с низкой возбудимостью уровни мРНК провоспалительных цитокинов в головном мозге снижаются в ответ на стресс, однако увеличение экспрессии IL 1 β через 24 дня после стресса в гиппокампе и усиление нейродегенерации в префронтальной коре на 7-й день позволяют ожидать отсроченных поведенческих нарушений у этой группы животных.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

ИЗМЕНЕНИЕ ХАРАКТЕРА МИГРАЦИИ КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ MCF10A ПОД ДЕЙСТВИЕМ МУТАЦИЙ PTEN И ZFNХ3, ВЫЯВЛЕННЫХ В ТКАНЯХ ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Али Даюб^{1,2}, А.И. Фокин³, Н. Новиков^{3,4}, Р. Воробьев⁴, Е.В. Денисов⁴, А.М. Готро³, А.Ю. Александрова²

¹Московский физико-технический институт, Москва; ²НИИ канцерогенеза им. Н.Н. Блохина, Москва;

³Институт Политехническая Школа, Париж, Палезо, Франция; ⁴НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск

Методом полноэкзомного секвенирования показано, что у пациенток с раком молочной железы (РМЖ) чаще всего встречаются мутации с подавленной активностью PTEN, также есть мутация ZFNХ3-/-, ассоциированная с плохим прогнозом. Методом CRISPR/Cas9 эти мутации реконструировали в эпителиальных клетках молочной железы MCF10A. Были получены клеточные линии PTEN-/- и ZFNХ3-/- и линия с двойным нокаутом {PTEN-/-ZFNХ3-/-}. Цель работы: проанализировать влияние этих мутаций на морфологию и миграцию клеток MCF10A. Проводили анализ движения небольших островков (7-10 клеток) и зарастания экспериментальной раны. Морфологию межклеточных контактов исследовали с помощью окрашивания E-кадгерина, оценивали количество и распределение маркера эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) белка виментина. В редкой культуре в обедненной среде клетки всех линий формируют островки. Не было отличий в содержании E-кадгерина между исследуемыми клеточными линиями (Вестерн-блоттинг), но конфокальная микроскопия показала, что у ZFNХ3-/- возникают большие промежутки между клетками, а клетки PTEN-/- образуют более плотные межклеточные контакты. Более того, у клеток ZFNХ3-/- межклеточные контакты радиального типа, а у клеток PTEN-/- сохраняется как тангенциальные, так и радиальные контакты, как у клеток дикого типа. Делеция ZFNХ3 приводит к увеличению количества виментин-положительных клеток внутри и на границах островков и монослоя, а делеция PTEN не привнесла изменений экспрессии и распределения виментина. Анализ миграции показал, что делеция PTEN приводит к ускорению направленной миграции островков, причем наблюдается скоординированное движение клеток в островке. Скорость зарастания раны у PTEN-/- так же увеличивается. В случае ZFNХ3-/- движение клеток внутри островков не скоординировано и общего направленного движения островков не наблюдается. Скорость зарастания раны так же не увеличена по сравнению с контролем. Двойной нокаут {PTEN-/-ZFNХ3-/-} не привнес к суммированию эффектов мутаций. Выводы: Нокауты PTEN и ZFNХ3 вызывают гибридный ЭМП, причем фенотип клеток ZFNХ3-/- ближе к мезенхимальному состоянию по сравнению с PTEN-/. Нокаут PTEN усиливает эффективность миграции эпителиальных клеток РМЖ за счёт перехода к коллективному движению.

Работа поддержана грантом РФФИ №18-54-16006 НЦНИЛ_a.

БЕЛКИ УРОКИНАЗНОЙ СИСТЕМЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

П.С. Климович^{1,3}, Е.М. Шеломенцева¹, К.А. Рубина¹, В.В. Какоткин², Н.А. Олейникова², М.А. Агапов²,
Е.В. Семина^{1,2,3}

¹Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова; ³Лаборатория молекулярной эндокринологии, Институт экспериментальной кардиологии, НИИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва

Повышение экспрессии урокиназы uPA и ее рецептора uPAR показано для многих типов опухолей. Связывание uPA с uPAR стимулирует пролиферацию и миграцию опухолевых клеток, запускает каскад внеклеточного протеолиза за счет активации плазмина, способствуя росту и инвазии опухоли. Избыточно секретируемая урокиназа, способна проникать в ядра клеток и запускать программу эпителиально-мезенхимального перехода, активируя миграторный фенотип клеток опухоли, их химиорезистентность и дормантность. Все это позволяет рассматривать урокиназную систему как мишень для диагностики опухоли, тяжести течения и прогноза. В работе изучали диагностическую значимость уровней uPA и uPAR в сыворотке крови и ткани опухоли у больных аденокарциномой ЖКТ. В исследование были включены 90 пациентов в возрасте от 30 до 85 лет с аденокарциномой ЖКТ и 25 здоровых доноров. Концентрации uPA/uPAR в сыворотке определяли методом ИФА, экспрессию в ткани оценивали методом ИГХ у 23 пациентов. Обработку ИГХ изображений производили в ПО QuPath версии 0.3.0. по разработанному авторами алгоритму. Было обнаружено достоверное повышение концентрации uPA в сыворотке онкобольных в среднем на 3,89 нг/мл у мужчин и на 3,20 нг/мл у женщин по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$), однако при этом повышения концентрации uPAR не наблюдалось. Для определения уровня экспрессии uPA и uPAR в ткани нами был разработан алгоритм анализа ИГХ изображений: при помощи машинного обучения произведена тренировка программы, позволяющей отделить опухолевые клетки от стромы, установлены параметры для сепарации ткани от фона и задана детекция сигнала надпороговой интенсивности в канале DAB. Мы обнаружили, что экспрессия uPA в ткани опухоли на 28% выше по сравнению с нормальной тканью, а уровень uPAR – на 15% выше ($p < 0,05$). При этом уровень экспрессии uPA и uPAR был достоверно выше в клетках опухоли, чем в окружающей их строме – в 2,5 и в 2,4 раза соответственно ($p < 0,05$). Таким образом, показана потенциальная диагностическая значимость сочетанной детекции uPA в сыворотке и в образцах ткани первичного опухолевого узла у пациентов с аденокарциномой ЖКТ. В то же время уровень uPAR в крови онкопациентов, несмотря на повышение его экспрессии в ткани, не повышается.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №20-015-00186).

НОВАЯ МОДЕЛЬ РЕЦИДИВА ОПУХОЛИ У МЫШЕЙ, ОСНОВАННАЯ НА ФЕНОМЕНЕ КОМПЕНСАТОРНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ

Л.С. Кузнецова¹, М.С. Истомина², Б.А. Маргулис¹, И.В. Гужова¹, В.Ф. Лазарев¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия; ²НМИЦ им. В.А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Рецидив опухолевого роста может возникать как в силу резистентности некоторых опухолевых клеток, так и из-за массовой клеточной гибели, происходящей в ответ на терапевтическое воздействие, что в литературе обычно называется компенсаторной пролиферацией. Целью данной работы стало создание модели рецидива опухолевого роста после химиотерапии на основе феномена компенсаторной пролиферации. Мы подошли к изучению влияния клеточной гибели, вызванной химиотерапевтическим воздействием, на пролиферацию выживших клеток с двух сторон. Первым подходом стало использование кондиционированной среды (КС), полученной от погибших от эпопозида клеток. С помощью метода прижизненной биолюминесценции мы показали, что опухоли, полученные в результате введения клеток карциномы легкого A549-luc, предварительно проинкубированных в КС, обладают большим сигналом люминесценции по сравнению с контролем, что в данном случае свидетельствует о более быстрой опухолевой прогрессии. Вторым подходом стало использование системы питающих клеток (ПК) и акцепторных клеток (АК). ПК в данном эксперименте выступали в качестве погибающей от химиотерапевтического воздействия части опухоли. АК имитировали выжившие клетки. С помощью метода прижизненной биолюминесценции мы показали, что туморогенез АК карциномы кишечника СТ-26 luc напрямую зависит от присутствия ПК СТ-26 wt в модели *in vivo*. Сравнивая две вышеописанных модели, мы пришли к выводу, что использование системы питающих и акцепторных клеток является более целесообразным решением в контексте рецидива опухолевого роста. Это связано с тем, что такой способ моделирования наиболее точно отражает физиологические аспекты рецидива опухоли. Также в данной работе мы апробировали методику ортотопического введения клеток СТ-26 luc. Опухоли, полученные после такой инъекции, были способны к спонтанному метастазированию в печень, легкие и селезенку, что было подтверждено методом количественной ПЦР. Таким образом, мы получили данные, позволяющие сформировать каркас для релевантной модели рецидива опухоли после химиотерапии, которая может быть основана на феномене компенсаторной пролиферации. *Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и Высшего образования РФ (проект №075-15-2020-773).*

МЕТАБОЛИЗМ ОПУХОЛИ И ЛИМФОЦИТОВ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИ-СТЛА-4 ИММУНОТЕРАПИИ

Г.В. Шаронов

¹НИИ ЭОиТМ, Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород;

²НИИ трансляционной медицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва;

³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Иммунотерапия с использованием ингибиторов контрольных точек активации иммунитета появилась 10 лет назад и уже стала терапией первой линии для некоторых типов рака. В 2011 и в 2014 годах были одобрены препараты анти-СТЛА-4 и анти-PD1 антител соответственно. Вторые оказались более эффективны и в настоящее время преобладают в клинической практике. Эффективность анти-СТЛА-4 терапии для меланомы и рака легкого составляет 10–40%. Сегодня ведется активный поиск различных сочетаний анти-СТЛА-4 терапии с другими видами терапии, но удачной оказалась пока лишь комбинация с анти-PD1. Недавние данные литературы и наши исследования показывают, что эффективность анти-СТЛА-4 терапии существенным образом зависит от взаимозависимого состояния метаболизма опухолевых клеток и опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. При этом, ингибиторы гликолиза, с одной стороны, подавляют рост опухолевых клеток, а с другой, способствуют формированию противовоспалительных лимфоцитов. Кроме этого, блокирование СТЛА-4 стимулирует окислительное фосфорилирование в лимфоцитах, что является негативным компенсаторным эффектом и препятствует эффективной инфильтрации опухоли лимфоцитами и развитию противоопухолевого иммунитета. В докладе будут представлены данные, доказывающие ключевую роль метаболизма в ответе на анти-СТЛА-4 терапию, а также представлена актуальная картина метаболического контроля иммунного ответа. От полноты данной картины будет зависеть возможность и эффективность избирательного терапевтического воздействия на метаболические пути с целью повышения эффективности терапии. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФ22-15-20072.*

АДАПТАЦИЯ, СТРЕСС И ЗДОРОВЬЕ

АДАПТАЦИЯ И ОПТИМИЗАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ГОРНЫХ ЖИТЕЛЕЙ МЕТОДОМ АДАПТИВНОГО БИОУПРАВЛЕНИЯ ПО ЭЭГ

Г.С. Джунусова, Н.У. Сагаева, С.Б. Ибраимов, Б.К.Карыпова, А.Р. Давлетбаева

Институт горной физиологии и медицины НАН КР, лаб. нейрофизиологии, Бишкек, Кыргызская Республика

Целью исследования явилось изучение нейрофизиологических механизмов индивидуальной чувствительности и устойчивости человека к воздействию факторов внешней среды с целью расширения способов оптимизации функциональных нарушений ЦНС. Несоответствие между адаптационными возможностями организма горцев и изменившимися условиями среды могут стать причиной дезадаптационных сдвигов, напряжения и утомления ЦНС, которые возникают на фоне действия гипоксической гипоксии, где ведущим механизмом является дефицит функциональных резервов основных систем организма, а также энергетический дисбаланс, что отражается на выраженности психоэмоциональных реакций и др. До сих пор не разработана тактика применения произвольной регуляции ЭЭГ при дезадаптационных сдвигах в горах с учетом индивидуальной структуры биоритмики мозга, что является особенно важным так как все компоненты ЭЭГ находятся в определенной взаимосвязи между собой, при этом, небольшие сдвиги одних параметров ведут к перестройке других ритмов мозга. Имеется тесная связь между характером структуры взаимодействия компонентов ЭЭГ и индивидуальными особенностями механизмов саморегуляции. Установлено, что наиболее эффективны сеансы биоуправления с биологически обратной связью по альфа- и тета-активности, что объясняется тем, что указанные ритмы образуют «функциональные ядра» в структуре взаимодействия ритмики мозга и отражают состояние основных регулирующих систем мозга. Результаты исследований показали, что тренинги адаптивного биоуправления по ЭЭГ, направленные на перестройку и формирование новых межцентральных взаимосвязей в ЦНС, являются условием, способствующим повышению устойчивости механизмов саморегуляции и нормализации состояний. Наличие сдвига ритмов в БОС тренингах у 90% испытуемых в сторону высоких частот (альфа-активности) с соответствующим снижением уровня тета-активности свидетельствует об эффективной оптимизации функционального состояния ЦНС у горцев. Показатели перестроек ЭЭГ являются критериями позволяющими судить о функциональном состоянии ЦНС. При этом пути оптимизации могут быть различными: активация зон мозга, путем навязывания ритмов, обеспечивающих включение неспецифической активирующей системы, и они выбираются на основании индивидуальных ЭЭГ показателей и нейрофизиологического статуса.

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ АДАПТАЦИИ СТУДЕНТОВ К УЧЕБНОЙ НАГРУЗКЕ

Ю.В. Кашина, В.М. Покровский

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

Цель исследования – применить комплексный анализ, включающий физиологические, психологические и молекулярно-генетические методы для оценки адаптации студентов-медиков (n=184) к учебному процессу.

В начале и в конце учебного года проводилась физиологическая проба сердечно-дыхательного синхронизма (СДС), позволяющая оценить регуляторно-адаптивные возможности (РАВ). Полученные значимые параметры СДС, по которым рассчитывается индекс регуляторно-адаптивного статуса (иРАС), у всех обследованных студентов изменялись в разной степени. На начальном этапе годового обучения преобладали студенты с высоким уровнем регуляторно-адаптивных возможностей, в конце года увеличивалось количество студентов с удовлетворительным уровнем. При этом у девушек в сравнении с юношами был выявлен более высокий уровень иРАС во все наблюдаемые периоды. Установлено, что фазы менструального цикла влияют на характер адаптации студенток-девушек к процессу обучения и определяют их РАВ. Динамика иРАС у девушек-медиков нестабильна и более благоприятна в фолликулиновую фазу овариально-менструального цикла по сравнению с лютеиновой фазой.

С помощью психофизиологических методов было установлено изменение психологического статуса студентов-медиков в конце учебного года, обусловленное умственным трудом. К концу учебного года более устойчивые РАВ и наименьшее снижение иРАС наблюдались у студентов флегматиков/сангвиников (на 20,5%) и классических флегматиков (на 18,1%). Тогда как холерики, меланхолики и меланхолики/холерики имели наибольший процент снижения данного количественного показателя (на 51,3%, 62,9%, 66,8% соответственно).

С помощью молекулярно-генетических методов обнаружены значимые ассоциации генов синтеза серотонина (*TRH1* и *TRH2*) и рецепторов серотонина (*5HTR2C* и *5HTR2A*). Согласно полученным данным хорошие РАВ организма связаны с высокой активностью серотонинергической нейромедиаторной системы на уровне рецепторного звена и нормальной активностью биосинтетического звена (ферментов триптофангидроксилазы 1 и триптофангидроксилазы 2). Тогда как низкие РАВ организма определяются низкой активностью уровня рецепции серотонина и повышением скорости биосинтеза данного нейромедиатора.

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ СИЛОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК СПОРТСМЕНОВ ЮНОШЕСКОЙ ШКОЛЫ С РАЗНЫМ ВЫБОРОМ СПОРТИВНОГО НАПРАВЛЕНИЯ

В.С. Алексеева¹, О.В. Ломтагидзе¹, Н.С. Кадникова²

¹Уральский федеральный университет, ²Спортивная школа «Виктория», Екатеринбург

В ходе подготовки юных спортсменов необходимо принимать во внимание их психофизиологические показатели, включая индивидуальный профиль асимметрии. Регулярная диагностика силы мышц является необходимым звеном контроля развития спортсмена, при этом конечный результат находится в соответствии как с биологическими закономерностями развивающегося организма подростка, так и с продолжительностью проводимых тренировок. Целью работы было определение вклада продолжительности обучения в спортивной школе, выбранного вида спорта и профиля асимметрии в развитие сило-

вых характеристик юных спортсменов. В исследовании приняли участие две группы мальчиков, учащихся спортивной школы в возрасте 10 - 13 лет, 17 лыжников и 26 футболистов. Период обучения детей в спортивной школе составлял 1-3 года. В ходе работы проводились регулярные динамометрия рук и ног, для определения ведущей руки использовался опросник Аннет. На начальных этапах тренировок спортсмены лыжники и футболисты не отличались по показателям динамометрии рук и ног. В то же время формирование силовых характеристик на протяжении трех лет занятий у спортсменов исследуемых групп шло неодинаково. У лыжников в этот период синхронно ($t > t_{кр}$, $p < 0,05$) росла сила обеих рук, в то время как у футболистов за три года обучения значимо ($T_{кр}$, $p < 0,05$). У футболистов наблюдаются отдельные корреляции между показателями рук и ног. Во всех исследуемых группах показатель асимметрии предпочитаемой руки по тесту Аннет не выявил соответствия с функциональной асимметрией силовых качеств. Таким образом направленные тренировки снижают функциональную асимметрию силовых характеристик и формируют функциональную систему их положительных взаимосвязей, при отсутствии же соответствующих тренировок с возрастом асимметрия силовых качеств увеличивается.

ВЛИЯНИЕ ДИНАМИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТРОНЕЙРОАДАПТИВНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ГЛЮКОЗЫ И ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА У КРЫС В МОДЕЛИ АЛЛОКСАНИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

О.И. Буланова, Т.С. Воронцова, С.Б. Егоркина, Л.С. Исакова

Ижевская государственная медицинская академия МЗ РФ, кафедра нормальной физиологии, Ижевск

На сегодняшний день представляет интерес поиск и применение неинвазивных, доступных и эффективных медицинских технологий, которые позволяли бы существенно оптимизировать результаты проводимой терапии путем повышения адапционного потенциала организма. К таким методам можно отнести динамическую электронейроадаптивную стимуляцию (ДЭНАС). Метод динамической электронейроадаптивной стимуляции официально зарегистрирован МЗ РФ (регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ за № ФС-2005/004 от 04 марта 2005г.). В наших опытах ДЭНАС применялась в модели аллоксаниндуцированной гипергликемии (однократное внутривенное введение аллоксана в дозе 170 мг/кг массы тела животного) у крыс с различной прогностической стрессустойчивостью, которую определяли тестированием в открытом поле с определением поведенческих показателей в течение 5 минут. В зависимости от параметров поведения крысы были разделены на пассивных и активных особей. Работа выполнена в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 года), и согласно приказу МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267. Всем животным опытной группы (20 особей) ДЭНАС проводили в течение 30 дней, прикладывая электроды прибора на хвост крыс на 10 минут ежедневно. Контрольной группе животных (20 особей) в аналогичных условиях использовали невключенный прибор. Введение аллоксана вызывало повышение содержания глюкозы у стресс-неустойчивых на 219% и у стресс-устойчивых животных на 157% по сравнению с пассивным контролем. Изменение количества гликированного гемоглобина при этом имело односторонний характер. Динамическая электронейроадаптивная стимуляция в этих условиях приводила к снижению содержания глюкозы у пассивных крыс на 60,9%, у активных на 76,4 %, соответственно по сравнению с данными контрольной группы. Уровень гликированного гемоглобина снижался в 2,5 и в 1,2 раза соответственно. Исходя из полученных данных, можно сделать заключение, что динамическая электронейроадаптивная стимуляция снижает степень выраженности гипергликемии, инициированной введением аллоксана. Сахароснижающий эффект проявлялся больше у животных с пассивным типом поведения.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СОДЕРЖАНИЯ КРЫС: ОБОГАЩЕННОЙ СРЕДЫ И ИЗОЛЯЦИИ, НА ИХ ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И БОЛЕВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

П.В. Пунина, О.П. Комкова, С.Е. Жуйкова, О.Ю. Морозова, Н.И. Ярушкина, Л.П. Филаретова

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Обогащенная среда может ослаблять физиологическое действие аверсивных стимулов у человека и животных, способствуя развитию устойчивости к действию стрессоров. В то время как изоляция, наоборот, усугубляет действие неблагоприятных факторов. В экспериментах на самцах крыс линии Спрей-Дуоли изучали влияние условий содержания: обогащенной среды и изоляции, на их двигательную активность и болевую чувствительность. Крыс в возрасте 1 месяц помещали в изоляцию (по 1 крысе в клетку) или обогащенную среду (по 6 крыс в клетку с обогащенной средой). Контролем для изоляции и обогащенной среды служили крысы, содержащиеся в стандартных лабораторных условиях (6 крыс в клетке). Ежедневно измеряли массу тела животных. Через месяц содержания в разных условиях у крыс тестировали соматическую болевую чувствительность, а через 2 дня после этого - двигательную активность в тредбане. Соматическую болевую чувствительность оценивали на основании латентного периода реакции облизывания лап в тесте «горячей пластины». Двигательную активность оценивали на основании пройденного крысой расстояния в тредбане в течение 35 мин (0 наклон, 9 м/мин). Масса тела постепенно увеличивалась во всех группах в течение одного месяца, однако у изолированных крыс увеличение массы тела было больше, чем у крыс, содержащихся в обогащенной среде и контрольной группе. Наибольшую чувствительность к действию термического болевого стимула продемонстрировали изолированные крысы, тогда как крысы, содержащиеся в обогащенной среде, наоборот, были наименее чувствительны к болевому воздействию. Наибольшая двигательная активность в тредбане наблюдалась у крыс, содержащихся в обогащенной среде, которые пробежали за данный интервал времени наибольшее расстояние по сравнению с изолированными и контрольными крысами. Таким образом, социальная изоляция является стрессором, ведущим к увеличению массы тела и усилению болевой чувствительности, тогда как обогащенная среда благотворно влияет на функциональное состояние организма: приводит к повышению двигательной активности и снижению соматической болевой чувствительности. *Исследование поддержано грантом НЦМУ (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020) Павловский центр "Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости".*

ГАСТРОПРОТЕКТИВНОЕ ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ: УЧАСТИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ ГОРМОНОВ Н.И. Ярушкина, О.П. Комкова, Л.П. Филаретова

Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Согласно результатам наших исследований, глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся при стрессе, являются гастропротективными факторами. Ярким подтверждением этого являются данные, демонстрирующие вовлечение глюкокортикоидов в реализацию гастропротективного действия стрессорного прекодиционирования. Более того, было выяснено, что глюкокортикоиды оказывают компенсаторное гастропротективное влияние при дефиците продукции одного из важнейших гастропротективных факторов: простагландинов, возникающем в результате действия индометацина (ИМ) - неселективного ингибитора циклооксигеназы 1 и 2. Цель исследования состояла в изучении влияния бега, как возможного прекодиционирующего стрессорного фактора, на чувствительность слизистой оболочки желудка (СОЖ) к ulcerогенному действию ИМ (35 мг/кг) и последующем исследовании участия глюкокортикоидных гормонов в реализации выявленного гастропротективного действия бега у крыс. Бег осуществлялся «добровольно» в колесе или «принудительно» на беговой дорожке; как однократно, так и многократно (ежедневно в течение 5 дней). Бег сам по себе приводил к повышению уровня кортикостерона в плазме крови и к развитию стресс-вызванной анальгезии (уменьшению соматической болевой чувствительности), что подтверждает, что бег в наших экспериментальных условиях являлся стрессорным фактором. «Добровольный» (2 ч/день) или умеренный «принудительный» бег (9 м/мин, 15 мин) оказывал гастропротективный эффект (уменьшал среднюю площадь ИМ-вызванных эрозий) только после ежедневного бега в течение 5 дней. В то же время интенсивный «принудительный» бег (15 м/мин, 30 мин) уменьшал ИМ-вызванное поражение СОЖ уже при однократном воздействии. Введение ингибитора синтеза глюкокортикоидных гормонов метирапона или антагониста глюкокортикоидных рецепторов RU 38486 приводило к устранению или ослаблению гастропротективного действия интенсивного «принудительного» бега. Таким образом, глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся при беге, могут вовлекаться в реализацию его гастропротективного эффекта при ulcerогенном действии ИМ. *Исследование поддержано грантом РНФ № 19-15-00430; грантом НЦМУ (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020) Павловский центр «Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости»*

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГЕМОГЛОБИНА И ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТОВ *SCORPAENA PORCUS* (LINNAEUS, 1758) В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ (ЭКСПЕРИМЕНТЫ *IN VIVO* И *IN VITRO*)

А.А. Солдатов, А.Ю. Андреева, Т.А. Кухарева, Е.С. Кладченко

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь

Изучено влияние гипоксии на ядерные эритроциты морского ерша (*Scorpaena porcus*) в условиях *in vivo* (цельная кровь) и *in vitro* (суспензии клеток). Исследовали диапазон концентраций $0,3-8,5 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$. Температура $14-16^\circ\text{C}$. Экспозиция – 4 часа. Показано, что при концентрациях кислорода в среде менее $2 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$ часть гемоглобина переходит ферри-форму. Эффект был особенно выражен при острых формах гипоксии (менее $1 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$). Максимальный уровень MtHb достигал 19–32%. Это подтверждено для условий *in vivo* и *in vitro*, то есть процессы, приводящие к росту уровня MtHb, в обоих случаях реализовались на уровне клеток красной крови и не были связаны с изменениями, происходящими в организме в целом. Умеренные формы гипоксии (до $2 \text{ мг O}_2 \text{ л}^{-1}$) не вызвали развития данной реакции. Рост содержания метгемоглобина в эритроцитах не влиял на уровень активных форм кислорода (флуоресценция DCF-AM) и целостность цитоплазматических мембран клеток (флуоресценция SYBR Green I и PI). Случай лизиса эритроцитов при гипоксии количественно совпадали с контрольными величинами, то есть процессы удерживались в пределах физиологической нормы.

ФИЗИОЛОГИЯ ДВИГАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ. КОСМИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

АВТОНОМНАЯ ТОНИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОСТУРАЛЬНОЙ МЫШЦЫ В УСЛОВИЯХ БЕЗОПОРНОСТИ: КОМПЕНСАЦИЯ ИЛИ УГЛУБЛЕНИЕ АТРОФИИ?

Б.С. Шенкман, В.Е. Калашников, С.А. Тыганов, К.А. Шарло, И.Д. Львова

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Рядом авторов отмечалось, что примерно через 3 суток функциональной разгрузки в камбаловидной мышце возобновляется ЭМГ-активность [Alford et al., 1987 и др.]. Электрическая активность постепенно нарастает и к 14-м суткам вывешивания достигают уровня виварного контроля. Нами недавно было показано, что в условиях безопорности происходит снижение экспрессии калий-хлоридного ко-транспортера KCC-2 в спинальных мотонейронах, приводящее к автономной генерации тонических сигналов, активирующих мышцу даже в условиях разгрузки. Применение прохлорперазина предотвращало снижение содержания KCC-2 и снизить электрическую активность камбаловидной мышцы в условиях моделируемой гравитационной разгрузки [Kalashnikov et al., 2021]. Это позволило оценить роль такой автономной активности в развитии мышечной атрофии. После 7-суточного вывешивания задних конечностей животного и ежедневных i.p. инъекций прохлорперазина, определяли степень мышечной атрофии и состояние маркеров сигнальных путей, контролируемых белковый обмен и миозиновый фенотип. Мы предположили, что уменьшение автономной активности приведет к углублению атрофии. Однако, при использовании прохлорперазина как сырая, так и сухая относительная масса камбаловидной мышцы, а также размеры волокон медленного типа не отличались от контрольного уровня. Было обнаружено, что повышенная экспрессия мышечных убиквитин лигас MuRF-1 и MAFbx/atrogen-1 полностью предотвращалась при введении прохлорперазина. При его действии снижение экспрессии 18S и 28S рибосомальной РНК, обычно наблюдаемое при разгрузке, не было выявлено. В то же время, прохлорперазин не оказывал влияния на фосфорилирование рибосомальной киназы p70S6k, экспрессию мРНК PGC1 α и синтазы NO. При введении прохлорперазина также не было предотвращено снижение фосфорилирования киназы гликогенсинтазы (GSK3 β). Интересно, что снижение экспрессии мРНК медленной изоформы миозина, всегда наблюдаемое при гравитационной разгрузке, с введением прохлорперазина было полностью предотвращено. Таким образом, снижение автономной тонической активности, вызванное действием прохлорперазина, сопровождается торможением атрофических процессов. При этом не наблюдается известного снижения экспрессии мРНК медленной изоформы миозина. *Исследование поддержано грантом РФФИ № 22-15-00151.*

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЧАСТОТНОЙ ЭЛЕКТРОМИОСТИМУЛЯЦИИ НА ВИЗУАЛЬНУЮ КОНТРАСТНУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПРИ СМЕНЕ УСЛОВИЙ ГРАВИТАЦИИ

И.И. Шошина¹, И.С. Зеленская², В.Ю. Карпинская¹, Е.С. Томиловская²

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; ²ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Микрогравитация в условиях космического полета часто приводит к структурным и/или функциональным изменениям мозга, офтальмологическим проблемам, потере пространственного ориентира. Поиск способов компенсации этих эффектов одна из основных задач космической медицины. Одним из популярных методов моделирования эффектов гравитационной разгрузки в наземных условиях является «сухая» иммерсия. В ходе двух серий исследований в условиях «сухой» иммерсии изучали контрастную чувствительность зрительной системы: исследованиях с курсом высокочастотной электромиостимуляции (ВЧЭМС) и без таковой. С помощью метода визоконтрастометрии регистрировали контрастную чувствительность в задаче обнаружения элементов Габора с пространственной частотой 0.4, 0.8, 1.0, 3.0, 6.0 и 10.0 цикл/градус. Исходили из представлений о специфичности нейронов магноцеллюлярной и парвоцеллюлярной систем к восприятию определенного диапазона пространственных частот. В исследовании с использованием ВЧЭМС применяли аппарат «Амплидин-ЭСТ». Измерения проводили за день до погружения (фон), на 1, 3, 5 погружения, а также на следующий день после выемки из ванны. Установлено значимое изменение контрастной чувствительности в диапазоне низких пространственных частот, к которым специфична магноцеллюлярная система, на третий день «сухого» погружения и после окончания эксперимента, по сравнению с фоновыми показателями. Полученные данные свидетельствуют о том, что при смене условий гравитации наблюдается доминирование активности магноцеллюлярной системы, формирующей дорзальный поток информации из каудальных во фронтальные отделы коры головного мозга, над вентральным потоком. Наблюдается, таким образом, перестройка во взаимодействии двух основных нейронных систем, обеспечивающих целостность восприятия. В условиях сухой иммерсии с курсом ВЧЭМС данный эффект отсутствовал. Можно предположить, что ВЧЭМС, увеличивая афферентный поток в условиях его дефицита при опорной разгрузке, нормализует взаимодействие дорзального и вентрального путей. Необходимы дальнейшие исследования влияния ВЧЭМС на чувствительность зрительной системы в условиях воздействия микрогравитации. *Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант №22-18-00074).*

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ С 21-СУТОЧНОЙ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ГИПОКИНЕЗИЕЙ

А.В. Шпаков^{1,2}, А.А. Пучкова¹, Е.С. Томиловская¹, В.П. Катунцев¹, Т.В. Сухоставцева¹, Е.П. Худякова¹,
Д.М. Ставровская¹, Г.К. Примаченко¹, В.М. Баранов¹

¹ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН; ²Федеральный научный центр физической культуры и спорта, Москва

Антиортостатическая гипокинезия с отрицательным углом наклона тела человека относительно горизонта является наиболее популярной и адекватной моделью, воспроизводящей физиологические изменения функций систем человека (сердечно-сосудистой, двигательной, сенсомоторной и др.) в условиях невесомости. В 2021 году ГНЦ РФ-ИМБП РАН был проведен эксперимент с 21-суточной антиортостатической гипокинезией (АНОГ). Основной задачей эксперимента являлось изучение влияния 21-суточной АНОГ на костно-мышечную, сенсомоторную и сердечно-сосудистую системы, на биохимические и иммунологические показатели организма человека. Эксперимент проведен с участием 6 испытуемых-добровольцев (масса тела 78,0±8,5 кг, длина тела 179,7±5,3 см, возраст 30,7±5,4 лет). Испытуемые в течение 21 суток находились в условиях АНОГ на медицинской кровати с углом наклона тела -6° относительно горизонта. Результаты эксперимента с 21-суточной АНОГ показали наличие изменений в состоянии и функционировании практически всех систем организма человека. Со стороны костно-мышечной системы следует отметить снижение скоростно-силовых показателей и снижение общего уровня физической работоспособности. Пребывание в условиях 21-суточной АНОГ сопровождалось изменениями регуляции системной гемодинамики, позной устойчивости, параметров внешнего дыхания. В условиях АНОГ выявлено снижение интенсивности метаболических реакций в скелетной мускулатуре и костной ткани, метаболические изменения в поджелудочной и предстательной железах. Кроме того, 21-суточная АНОГ вызывает умеренные изменения параметров плазменного компонента системы регуляции агрегатного состояния крови. В отсутствие признаков развития стресс-реакции наблюдалась тенденция к гипокоагуляции. Механизмы адаптационной перестройки системы иммунитета обусловили сдвиги параметров, характеризующих состояние системы естественной цитотоксичности и адаптивного иммунитета. *Проведенное исследование является началом серии экспериментов с анти- и ортостатической гипокинезией, которые планируется проводить на базе Уникальной научной установки ГНЦ РФ-ИМБП РАН. Программа исследования поддержана грантом РФФИ № 19-15-00435. Исследования работоспособности поддержано Российской академией наук (63.1). Иммунологические исследования поддержаны Российской академией наук (65.1).*

ВЛИЯНИЕ 7-СУТОЧНОЙ «СУХОЙ» ИММЕРСИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПРОФИЛЬ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ЧЕЛОВЕКА, НЕСУЩИХ РАЗЛИЧНУЮ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ НАГРУЗКУ

А.А. Борзых¹, Р.Ю. Жедяев¹, Т.Ф. Вепхвадзе^{1,2}, Е.М. Леднев¹, Е.С. Мотанова¹, П.А. Махновский¹, А.С. Боровик¹,
О.И. Орлов¹, Е.С. Томиловская¹, Д.В. Попов^{1,2}

¹ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Цель исследования – оценить влияние 7-суточной «сухой» иммерсии на функциональные возможности (максимальная сила, работоспособность и дыхание митохондрий) m.soleus и m.vastus lateralis человека и сопоставить эти изменения с изменениями транскриптомного профиля этих мышц. У десяти молодых здоровых мужчин-добровольцев до и после 7-суточной «сухой» иммерсии оценивали максимальную произвольную изометрическую силу (МПС) мышц-разгибателей коленного сустава и сгибателей голеностопного сустава, а также работоспособность этих мышечных групп в тесте с возрастающей нагрузкой. Пробы мышечной ткани из m.soleus и m.vastus lateralis брали до и на шестые сутки нахождения в иммерсии для оценки скорости дыхания митохондрий в пермеабелизованных мышечных волокнах и транскриптомного профиля (РНК секвенирование, NextSeq 550, Illumina). «Сухая» иммерсия вызвала сопоставимое снижение МПС исследуемых мышечных групп; снижение аэробной работоспособности наблюдалось только для мышц-разгибателей бедра. Максимальная разобщенная и АДФ-стимулированная скорость дыхания митохондрий была выше в m.soleus, чем в m.vastus lateralis, однако вызванное иммерсией снижение этих показателей было сопоставимо для исследуемых мышц. До воздействия транскриптомный профиль мышц значительно различался. Пребывание в иммерсии оказало более выраженное влияние на изменение (преимущественно снижение; Padj <0.01, FC >1.5) генной экспрессии в m.soleus, чем в m.vastus lateralis (710 vs. 206 генов). В m.soleus изменение транскриптомного профиля было ассоциировано главным образом со снижением экспрессии генов митохондриальных белков и регуляторов жирового обмена. В m.vastus lateralis изменение транскриптомного профиля было ассоциировано преимущественно со снижением экспрессии генов внеклеточного матрикса. Недельное пребывание в условиях опорной разгрузки приводит к сопоставимому снижению функциональных возможностей мышц-разгибателей коленного сустава и сгибателей голеностопного сустава, тогда как изменение транскриптомного профиля в исследуемых мышцах различается и более выражено в постуральной m.soleus, чем в m.vastus lateralis. *При поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-298 от 18.04.2022 г.*

ВЛИЯНИЕ МОДЕЛИРУЕМЫХ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА СИСТЕМУ ПЛАЗМЕННОГО ГЕМОСТАЗА ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ С 21-СУТОЧНОЙ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ГИПОКИНЕЗИЕЙ

А.Ю. Кочергин, А.А. Маркин, О.А. Журавлева, Л.В. Вострикова, И.В. Заболотская, Д.С. Кузичкин, Т.В. Журавлева

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Система гемостаза является важным компонентом формирования гомеостатического равновесия в организме человека. При экстремальных воздействиях ее реакции в значительной мере определяют способность организма к адаптации. Истощение компенсаторных возможностей данной системы может привести к появлению тромбофилических состояний и развитию гиперкоагуляции. Известно, что коагуляционный потенциал и активность компонентов гемостаза зависят от параметров гемодинамики и гемореологии, которые в значительной мере определяются уровнем двигательной активности, положением

тела, воздействием на него гравитационных сил. Антиортостатическая гипокинезия широко используется в качестве модели, имитирующей воздействие микрогравитации на организм человека. Влияние микрогравитации на систему гемостаза до сих пор остается малоизученным. Целью данного исследования явилось изучение влияния 21-суточной антиортостатической гипокинезии с углом наклона -60 на систему гемостаза здорового человека. В эксперименте принимали участие 6 здоровых мужчин в возрасте от 24 до 41 года. Все участники эксперимента 3 недели находились в антиортостатическом положении с углом наклона -60 в краниальном направлении. Взятие венозной крови осуществлялось натощак за 7 суток до начала эксперимента, на 2, 5, 8, 21-е сутки воздействия и на 7-е сутки периода восстановления. В цитратной плазме определяли концентрации фибриногена и Д-димера, величины тромбинового времени, активированного частичного тромбопластинового времени, протромбинового времени, а также активность протеина С. Установлено, что при острой адаптации к антиортостатической гипокинезии (от начала и до 5-х суток) наблюдается тенденция к гипокоагуляции, а период со второй недели воздействия и до его окончания характеризуется тенденцией к восстановлению гемостатического баланса за счет усиления прокоагулянтных процессов. Данная проблема требует дальнейшего изучения, так как при увеличении продолжительности воздействия могут наблюдаться более выраженные сдвиги гемостатических реакций.

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ НА РАННИЙ ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ОТВЕТ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ЧЕЛОВЕКА НА ПРИЕМ ПИЩИ

П.А. Махровский¹, И.А. Скляник^{1,2}, Е.М. Леднев^{1,2}, Т.Ф. Вепхвадзе^{1,3}, Н.С. Курочкина¹, А.В. Воротников^{1,4}, М.В. Шестакова², Д.В. Попов^{1,3}

¹ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН; ²«НМИЦ эндокринологии МЗ РФ»; ³МГУ им. М.В. Ломоносова;

⁴НМИЦ кардиологии МЗ РФ, Москва

В покое на скелетные мышцы приходится до 80% инсулинозависимого захвата глюкозы, что свидетельствует об исключительной роли этой ткани в развитии метаболических нарушений. Влияние инсулина на изменение внутриклеточной сигнализации, регулирующей захват глюкозы скелетной мышцей, изучено достаточно хорошо, тогда как влияние инсулина на изменение генной экспрессии остается практически неизученным. В работе исследовались ранние изменения генной экспрессии в скелетной мышце после приема пищи у людей с ожирением и сахарным диабетом 2 типа (СД2Т). Пробы венозной крови и ткани из *m. vastus lateralis* были взяты до и через 1 ч после приема смешанной пищи (Nestle Resource 2.0; 3 мл/кг массы тела) у здоровых людей (ИМТ <25,0) и пациентов (ИМТ ≥35,0) с ожирением (Ож) с и без СД2Т (по 6 человек в группе). Изменение транскриптомного профиля в мышце оценивали с помощью РНК секвенирования (NextSeq 550, Illumina). Для исследования генных ответов на типовой прием пищи массу принимаемой пищи рассчитывали относительно массы тела. Поэтому в группе Ож содержание инсулина крови через 60 мин после приема пищи достигало ~160 мМЕ/л, а в группах контроль и Ож+СД2Т около 40 мМЕ/л. Увеличение эндогенного инсулина привело к сопоставимому изменению экспрессии генов (более сотни) в группах контроль и Ож, тогда как изменение экспрессии в группе Ож+СД2Т было менее выражено. Среди генов, изменивших экспрессию, присутствовали гены, кодирующие стресс-зависимые транскрипционные факторы раннего ответа. В скелетной мышце пациентов с ожирением изменение транскриптомного профиля при приеме пищи сопоставимо с ответом у здоровых людей, что объясняется более выраженным инсулиновым ответом на прием пищи. Тогда как транскриптомный ответ у пациентов с ожирением и СД2Т значительно изменен относительно здорового контроля. *Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-10146).*

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ МЕХАНО-УПРАВЛЯЕМЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ В РЕГУЛЯЦИИ АНАБОЛИЧЕСКОГО СИГНАЛИНГА И СИНТЕЗА БЕЛКА В ПОСТУРАЛЬНОЙ МЫШЦЕ КРЫСЫ

Т.М. Мирзоев, С.А. Тыганов, Б.С. Шенкман

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Ведущая роль в механотрансдукции принадлежит механо-управляемым ионным каналам, активация которых инициируется деформацией/растяжением плазматической мембраны. Роль данных каналов в реализации анаболического сигнала (механические стимулы/физическая нагрузка) в скелетных мышцах млекопитающих остаётся малоисследованной. В настоящем докладе будет проведён обзор актуальных данных, касающихся вклада механо-управляемых ионных каналов в регуляцию внутриклеточных анаболических процессов в атрофированной камбаловидной мышце (*m. soleus*) после эксцентрических сокращений, а также в период острой реадaptации атрофированной *m. soleus* после функциональной разгрузки. Кроме того, в докладе будут представлены перспективы дальнейшего исследования роли механо-управляемых ионных каналов в скелетных мышцах млекопитающих. Ключевые результаты заключаются в следующем. Степень фосфорилирования маркеров активности TORC1-сигналинга и прирост интенсивности синтеза белка в изолированной *m. soleus* в ответ на механическую стимуляцию был значительно меньше после функциональной разгрузки по сравнению с контрольными мышцами. При добавлении GdCl₃ (ингибитор механо-активируемых каналов) в среду с изолированной *m. soleus* после периода функциональной разгрузки наблюдалось такое же снижение активности анаболических маркеров и синтеза белка в ответ на механический сигнал, как и в случае с атрофированной мышцей без добавления соли гадолиния. Введение лабораторным животным соли гадолиния во время острого периода восстановления (12 часов) после функциональной разгрузки предотвращает повышение интенсивности белкового синтеза, а также гиперфосфорилирование маркеров mTORC1 (p70S6K, rpS6 и 4E-BP1). Полученные данные показывают, что 1) снижение анаболического ответа в атрофированной мышце при механической стимуляции может быть связано с инактивацией механо-управляемых ионных каналов; 2) нормальное функционирование механо-управляемых ионных каналов необходимо для полной активации анаболических процессов в *m. soleus* крысы во время острой фазы реадaptации после функциональной разгрузки. *Работа поддержана грантом РНФ № 22-75-10046.*

НЕЙРОПРОТЕЗИРОВАНИЕ ПРИ ПОРАЖЕНИЯХ СПИННОГО И ГОЛОВНОГО МОЗГА

П.Е. Мусиенко^{1,2}

¹Лаборатория нейропротезов, Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет; ²Лаборатория нейромодуляции, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Заболевания нервной системы, сопровождающиеся нарушениями сенсомоторных и висцеральных функций (паркинсонизм, травматические поражения спинного и головного мозга и др.), представляют собой комплексную медико-социальную проблему. Актуальной задачей является разработка новых методов нейрореабилитации, что требует изучения нейронных сетей на экспериментальных моделях, выявления механизмов их работы в норме и патологии, создания технологий восстановления. В ходе исследований методов нейропротезирования обнаружены структурные и функциональные особенности нейронных сетей спинного мозга, ответственных за контроль локомоторной активности и мочеиспускания. Внутриспинальная мультисклеточная регистрация позволила проанализировать активность нейронов в разных участках серого вещества поясничного утолщения. Картирование спинного мозга выявило нейрональные популяции, отвечающие за генерацию локомоторной активности при движении в разных направлениях. Иммуногистохимическими методами выполнено детальное исследование распределения в сером веществе спинного мозга нейронов, задействованных в контроле движения и висцеральных систем. Установлено, что при ходьбе в активность вовлекаются не только локомоторные нейронные сети, но и спинальные области, отвечающие за висцеральный контроль, причем степень их вовлечения зависит от особенностей локомоторного паттерна и, в частности, от направления ходьбы. Предложены подходы для управления сенсомоторными функциями на моделях парализованных животных, в частности, алгоритм стимуляции спинного мозга электродными матрицами, который воспроизводит естественную динамику активации моторных нейронов во время передвижения. Апробирован спектр материалов для нейропротезов, включая композиты силикона с углеродными нанотрубками или металлами. Созданы и апробированы образцы нейрональных имплантов на их основе для нейропротезирования при поражении спинного и головного мозга. Работа проводилась при поддержке гранта РНФ 22-15-00092.

МЕТФОРМИН ПРЕДОТВРАЩАЕТ ТРАНСФОРМАЦИЮ МИОЗИНОВОГО ФЕНОТИПА И ПОВЫШЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ПРОТЕОЛИЗА В КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЕ КРЫС НА ФОНЕ 7-СУТОЧНОГО ВЫВЕШИВАНИЯ

К.А. Шарло, С.П. Белова, К.А. Зарипова, И.Д. Львова, Т.Л. Немировская

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Трансформация миозинового фенотипа, нарушение кальций-зависимых регуляторных путей и активация убиквитин-протеасомной системы в условиях функциональной разгрузки скелетных мышц может быть связана с состоянием энергосенсора скелетной мышцы, АМФ-зависимой протеинкиназы (АМПК). Мы предположили, что предотвращение снижения фосфорилирования АМПК в течение первой недели вывешивания задних конечностей крыс может препятствовать как трансформации миозинового фенотипа камбаловидной мышцы (*m soleus*), так и ее атрофии. 32 самца крыс линии Вистар были разделены на четыре группы: контроль с плацебо (С), сидячий контроль с введением метформина (С+М), 7-суточное вывешивание задних конечностей с введением плацебо (7HS) и 7-суточное вывешивание с введением метформина (7HS+М, 300 мг/кг). В камбаловидной мышце животных из вывешенной группы была обнаружена трансформация миозинового фенотипа волокон в «быструю» сторону ($p < 0.05$) и снижение в миоцарах активаторов экспрессии медленного миозина MEF-2D и p300 (на 76% и 55% соответственно, $p < 0.05$). Мы также обнаружили снижение содержания р-АСС (ацетил-КоА-карбоксилазы, мишени АМПК) на 24%, увеличение содержания р-CaMK II и E3 лигаз MuRF-1 и atrogen-1 в сравнении с контрольной группой ($p < 0.05$). Применение метформина частично предотвратило трансформацию миозинового фенотипа волокон камбаловидной мышцы в «быструю» сторону, как и снижение MEF-2D и p300 в миоцарах, а также полностью предотвратило снижение р-АСС ($p < 0.05$). Введение метформина не повлияло на содержание и активность NFATc1. Выводы: применение метформина на фоне 7-суточного вывешивания задних конечностей крыс предотвращает: 1) трансформацию миозинового фенотипа волокон; 2) снижение содержания MEF-2D и p300 в мышечных ядрах; 3) снижение р-АСС; 4) повышение экспрессии мРНК MuRF-1, atrogen-1, убиквитина и миостатина. Введение метформина не предотвращает атрофию *m soleus*. Работа поддержана грантом РНФ No. 21-15-00228.

ИЗМЕНЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ВЕРТИКАЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ 21-СУТОЧНОЙ И 5-СУТОЧНОЙ ОПОРНОЙ РАЗГРУЗКИ

Н.В. Шишкин, В.В. Китов, Е.С. Томиловская

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Отечественными и американскими учёными были выявлены глубокие нарушения постуральной устойчивости после космических полётов (КП) (Козловская и др., 1981-1990; Paloski et al., 1992; Wood, 2012-2015). Одним из способов моделирования эффектов воздействия факторов КП на сенсомоторную систему является «сухая» иммерсия (СИ), представляющая собой ванну, покрытую прорезиненной тканью, предотвращающей контакт кожи испытуемого с водой. В данном исследовании мы сравнили влияние 21-суточного и 5-суточного пребывания в СИ на параметры вертикальной стойки человека. В исследовании приняли участие 20 добровольцев мужского пола в возрасте от 22 до 55 лет, по 10 человек в группах 21-суточной и 5-суточной СИ. Исследования проводили до погружения в СИ и во время первой вертикализации после окончания воздействия. Для оценки стабиллографических параметров использовали стабиллоплатформу Стабилан-02 (ОКБ «Ритм», Россия). Регистрировали разброс колебаний центра давления (ЦД) при стойке с открытыми и закрытыми глазами на твёрдой опоре, а также с закрытыми глазами на мягкой опоре – поролоновой подушке толщиной 20 см. Тесты проводили последовательно друг за другом, каждый продолжительностью 40 секунд с паузами между ними, в течение которых испытуемый садился на стул на 5-10 секунд. Анализировали относительное изменение разброса колебаний ЦД – среднее отношение величин разброса до СИ и после ее завершения. Исследования не выявили значимого увеличения относительного изменения разброса ни в одном из

3-х тестов после 21-суточного воздействия. После более короткого, 5-суточного воздействия в тесте с открытыми глазами на твердой опоре изменений не наблюдалось, однако в тесте с закрытыми глазами на твердой опоре регистрировалось значимое (+26%) увеличение относительного разброса. При стойке на мягкой опоре с закрытыми глазами наблюдалось значимое увеличение исследуемого параметра (+67%), а также достоверное отличие от группы 21-суточной СИ. Из сказанного выше можно предположить, что 5-суточная СИ приводит к более выраженным изменениям поструральной устойчивости, чем 21-суточная, вероятно вследствие активации адаптационных механизмов после завершения острого периода воздействия (первые 5 суток). *Работа поддержана Российской научным фондом (№19-15-00435П).*

ВЛИЯНИЕ КУРСА МОДУЛИРОВАННОЙ ЭЛЕКТРОМИОСТИМУЛЯЦИИ НА МЫШЕЧНЫЙ ТОНУС НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ ПРЕКЛОННОГО ВОЗРАСТА

Н.М.А. Абу Шели¹, Л.Е. Амирова¹, М.А. Авдеева², А.А. Гудкова², А.А. Савеко¹, А.Б. Гехт², Е.С. Томиловская¹

¹Лаборатория гравитационной физиологии сенсомоторной системы, ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН; ²Консультативно-диагностическое отделение, Научно-практический психоневрологический центр им. С.М. Соловьева, Москва

Доклад посвящен первым результатам применения электромиостимуляционных подходов (ЭМС), разработанных для советских спортсменов и космонавтов, в реабилитации неврологических пациентов преклонного возраста. В исследовании приняли участие пациенты 73,8±7,0 лет с подтвержденными нарушениями функции ходьбы и равновесия, с хронической ишемией головного мозга в анамнезе. В настоящий момент участие в исследовании успешно завершили 34 пациента. Пациенты были разделены на две группы – группу стимуляции (n=26) и контрольную группу (n=8). Пациентам группы стимуляции был проведен двухнедельный курс модулированной ЭМС мышц бедра и голени от 3 до 9 процедур. Предварительные результаты исследования показали хорошую переносимость ЭМС пациентами. После завершения курса группа стимуляции показала достоверное улучшение по отношению к исходным значениям в неврологических тестах Tinetti test, Rivermead Mobility Index и Timed Up and Go Test. Исследование мышечного тонуса методом миотометрии не выявило достоверных однонаправленных изменений после курса электромиостимуляции. В то же время в группе стимуляции поперечная жесткость прямой мышцы бедра у 56% (13 пациентов) увеличилась на 13,41±4,59% (p=0,10), а у 44% (10 пациентов) - уменьшилась на 8,47±1,62% (p=0,02). Поперечная жесткость латеральной икроножной мышцы у 48% (11 пациентов) после курса электромиостимуляции увеличилась на 10,44±3,32% (p=0,24), а у 52% (12 пациентов) - уменьшилась на 7,74±1,09% (p<0,0001). У пациентов контрольной группы достоверных изменений в аналогичных тестах и обследованиях не наблюдалось. Разнонаправленный характер изменений поперечной жесткости мышц бедра и голени после курса ЭМС представляет интерес для дальнейшего анализа. *Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2022-298 от 18.04.2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидии из федерального бюджета на оказание государственной поддержки в создании и развитии научно-исследовательского центра мирового уровня "Павловский центр интегративной физиологии в медицину, высокотехнологичное здравоохранение и технологии стрессоустойчивости".*

СВЯЗЬ ОСЦИЛЛЯТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ БИОПОТЕНЦИАЛОВ МОЗГА С МОТОРНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ (АРТРОГРИПОЗ И ПАРЕЗ ЭРБА) У ДЕТЕЙ

Е.Д. Благовещенский¹, О.Е. Агранович¹, М.М. Корякина¹, Д.О. Бредихин², А.Н. Шестакова²

¹НМИЦ детской травматологии и ортопедии имени Г. И. Турнера МЗ РФ, Санкт-Петербург; ²Центр нейроэкономики и когнитивных исследований, Институт когнитивной нейронауки, НИУ Высшая школа экономики, Москва

Артрогрипоз и парез Эрба являются одними из наиболее тяжелых пороков развития опорно-двигательного аппарата, характеризующийся наличием двух и более контрактур крупных суставов, поражением мышц, а также передних рогов спинного мозга. Одной из основных проблем, обуславливающих ограничение или невозможность самообслуживания пациентов, является отсутствие активных движений в суставах верхних конечностей, которое восстанавливается путем аутоотрансплантации мышц различных донорских областей. Процессы восстановления после таких операций связаны, в том числе и с нейрональными перестройками в центральной нервной системе (ЦНС). Одной из особенностей данного процесса является влияние активности коры головного мозга на процессы реабилитации, т.к. процессы с планированием и контролем произвольных движений ассоциируются именно с этим отделом нервной системы. В данной работе проводилось изучение электрофизиологических показателей активности коры головного мозга у детей с диагнозом артрогрипоз / парез Эрба и у здоровых детей сходного возраста. Оценивались такие показатели электроэнцефалограммы (ЭЭГ), как амплитуда и длинно-временные корреляции (ДВК, метод оценки динамики нейрональной активности) в диапазонах 4-8, 8-12 и 12-16 Гц. Анализ данных показал, что у детей с артрогрипозом, по сравнению с детьми без патологий, имеется достоверное снижение амплитуды ЭЭГ по всем исследованным диапазонам. Также были обнаружены изменения ДВК в области альфа и бета ритмов. Полученные результаты отражают связь электрофизиологических параметров коры головного мозга и процессов, связанных с патологией артрогрипоза и пареза Эрба. Кроме того, были выявлены особенности ЭЭГ связанные с уровнем поражения спинного мозга – падение ритмов было тем существеннее, чем больше был уровень поражения. Полученные данные свидетельствуют, что ЭЭГ, в частности выраженность амплитуды и ДВК ритмов, может быть одним из биомаркеров заболеваний, связанных с моторными расстройствами.

РОЛЬ СФИНГОМИЕЛИНАЗЫ И ЦЕРАМИДА В ИЗМЕНЕНИЯХ ДИСТРОФИНА И БЕТА-ДИСТРОГЛИКАНА В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ, ПОДВЕРГНУТЫХ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКЕ

И.Г. Брындина, А.В. Секунов, В.А. Протопопов

Ижевская государственная медицинская академия, Ижевск

Установлено, что в условиях внешних стрессорных воздействий церамид, образованный путем сфингомиелиназного гидролиза, может быть вовлечен в реорганизацию цитоскелета клеток (Zeidan et al., 2008). Роль сфинголипидов в перестройке компонентов субсарколеммального цитоскелета в волокнах постуральной мышцы (*m. soleus*), подвергнутой гравитационной разгрузке, ранее не исследовалась. Цель работы - изучение роли сфингомиелиназы / церамида в возникающих при разгрузке изменениях компонентов дистрофин-ассоциированного гликопротеидного комплекса и оценка возможности коррекции этих изменений путем блокады образования церамида с помощью функциональных ингибиторов кислой сфингомиелиназы. Эксперименты *in vivo* проведены на взрослых белых крысах-самцах (180-230г), разделенных на три группы: 1- виварный контроль, 2 – группа, подвергнутая антиортостатическому вывешиванию (АОВ) в течение 14 дней на фоне введения ингибитора кислой сфингомиелиназы и 3 – АОВ с введением 0,9% раствора NaCl. Опыты *ex vivo* проводили на нервно-мышечных препаратах, полученных от интактных крыс и инкубированных с экзогенной сфингомиелиназой. Оценку результатов проводили с помощью иммунофлуоресцентного исследования срезов мышц или мышечных препаратов, обработанных антителами к дистрофину или бета-дистрогликану. Нами показано, что в эксперименте *ex vivo* при действии на мышцу экзогенной сфингомиелиназы уровень иммунофлуоресценции дистрофина и бета-дистрогликана в области сарколеммы существенно снижался, а церамида - возаостал. Такие же результаты наблюдали при 14-дневном АОВ. Применение ингибитора кислой сфингомиелиназы в опыте *in vivo* частично предотвращало снижение иммунохимического дистрофина и бета-дистрогликана. Полученные данные свидетельствуют о том, что перестройка компонентов цитоскелета в условиях гравитационной разгрузки может быть частично ассоциирована с активацией сфингомиелиназного гидролиза. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-315-90099.*

ГИПОБАРИЧЕСКАЯ АТМОСФЕРА КОСМИЧЕСКОГО КОРАБЛЯ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЕКОМПРЕССИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ВНЕКОРАБЕЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КОСМОНАВТОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ЛУНЫ

В.П. Катунцев

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Работа посвящена обоснованию перспективных методов обеспечения декомпрессионной безопасности внекорабельной деятельности (ВКД) космонавтов при работе в скафандрах на поверхности Луны. Рассматриваются преимущества и недостатки используемых в современной пилотируемой космонавтике методов защиты участников ВКД от высотной декомпрессионной болезни (ВДБ) в скафандрах «Орлан» и ЕМУ, предназначенных для выполнения ВКД в условиях микрогравитации. Подчеркивается, что для повышения оперативности подготовки к ВКД, создания безопасных и комфортных условий работы космонавтов на поверхности Луны требования к лунному скафандру должны включать надежную защиту членов экипажа от ВДБ с нулевым (или очень коротким) периодом процедуры преоксигенации, высокую гибкость скафандра с оптимальной конструкцией сочленений для выполнения движений и низкую массу снаряжения. Описывается выявленная экспериментальным путем закономерность, отражающая характер зависимости риска возникновения ВДБ от соотношения величины исходного парциального давления азота в окружающей газовой атмосфере и уровня пониженного давления в скафандре, к которому переходит космонавт перед началом ВКД. На основании анализа результатов исследований, выполненных в нашей стране и за рубежом, обосновывается заключение о том, что перспективным методом обеспечения высокого уровня декомпрессионной безопасности участников ВКД при полете на Луну и работе на ее поверхности является использование в кабине космического корабля и лунной базы нормоксической N_2-O_2 газовой среды с пониженным до 73-56 кПа общим давлением. В исследованиях с подъемами добровольцев в высотной барокамере показано, что 24-часовое пребывание в нормоксической N_2-O_2 атмосфере с давлением 73-56 кПа позволяет обеспечить декомпрессионную безопасность последующего перехода к давлению 29,3–26,4 кПа и выполнение при таком уровне рабочего давления скафандра 6-часовой работы по имитации ВКД. Выбор конкретного варианта состава гипобарической атмосферы для космического корабля и уровня давления лунного скафандра должен осуществляться с учетом научно-технических возможностей предприятий, ответственных за разработку пилотируемых космических объектов и скафандров, предназначенных для выполнения космонавтами работ на лунной поверхности.

ВЛИЯНИЕ СНИЖЕННОЙ АКТИВНОСТИ НА СКОРОСТЬ РАЗВИТИЯ СИЛЫ МЫШЦ У ЧЕЛОВЕКА

Ю.А. Коряк, Р.Р. Прочий, Н.С. Кнутова *ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва*

Во многих ситуациях, когда время развития силы ограничено, как при спортивных упражнениях (Tillin et al., 2013), при стабилизации позы в случае потери равновесия (Behan et al. 2018), функционально важным является развитие больших мышечных усилий в короткие промежутки времени, так называемая «взрывная» сила (Защиорский, 1968). Способность производить быстрые усилия требует быстрого рекрутирования двигательных единиц, высокой скорости их разряда и сильных сокращений. Однако роль разгрузки мышечного аппарата на проявление максимальной скорости развития силы при произвольных усилиях не были предметом изучения. В настоящем исследовании изучалась адаптация мышечного аппарата к 21-суточной разгрузке на кинетику развития силовых и скоростно-силовых свойств мышц-разгибателей стопы. Шесть мужчин приняли участия в исследовании. В качестве разгрузки мышц использовали постельный режим в антиортостатическом положении в течение 21 суток. До и после разгрузки с использованием динамометра Biodex регистрировали максимальную произвольную силу (МПС), силу произвольного «взрывного» сокращения, силу с интервалом 50 мсек от начала «взрывного» усилия (F50, F100, F150, F200, F250 и F300). После разгрузки обнаружено увеличение МПС на 4 %, снижение относительной

(% МПС) скорости нарастания произвольного сокращения. Нормализованная величина dP/dt увеличилась на 4,5 % ($p < 0.05$). Произвольная F50 существенно увеличилась ($p < 0.05$). В настоящем исследовании мы представили поведение мышечного аппарата у человека после 21-суточной разгрузки во время быстрых произвольных «взрывных» сокращений. Насколько известно, наши результаты впервые демонстрируют, что 21-суточный постельный режим не сопровождался снижением генерации МПС и скорости ее развития. Таким образом, при устранении гравитации показатели МПС и градиент произвольного «взрывного» усилия оказывают влияние лишь на начальной фазе кривой сила-время. По-видимому, несмотря на сниженную активность, отмечается усиленный возбуждающий афферентный вход (Clark et al., 2007, Seynnes et al., 2008), к мышце-агониста произвольного движения, что предполагает снижение пресинаптического торможения афферентов I-a (Sugajima et al., 1995; Lundbye-Jensen, Nielsen, 2008), обуславливая увеличение скорости развития ранней фазы силы (Andersen et al., 2009). Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда — грант № 19-15-00435.

ЭФФЕКТЫ ТРАНССПИНАЛЬНОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ, ОЦЕНИВАЕМЫЕ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСКРАНИАЛЬНОЙ МАГНИТНОЙ СТИМУЛЯЦИИ

Е.Д. Помелова, А.В. Попыванова, М.А. Корякина, Н.А. Илюкина, Д.О. Бредихин, А.Н. Шестакова, Е.Д. Благовещенский *Центр нейроэкономики и когнитивных исследований, Институт когнитивной нейронауки, НИУ Высшая школа экономики, Москва*

Транспинальная стимуляция постоянным током (tsDCS) представляет собой неинвазивный метод воздействия на активность спинного мозга, однако на данный момент нет четкого понимания эффектов данной стимуляции. Предполагается, что tsDCS модулирует активность кортико-спинального тракта, возбудимость мотонейронов, вызванную активацией первичной моторной коры (M1). Целью исследования является изучение влияния анодной tsDCS на уровне C7 спинного мозга на вызванные моторных ответы (ВМО) от транскраниальной магнитной стимуляции (ТМС) в области M1. В эксперименте приняли участие 24 здоровых человека в возрасте 22+/-4 года, все испытуемые были разделены на 2 группы, для первой группы был применен протокол анодной tsDCS, стимулирующий электрод располагался над сегментом C7, отводящий электрод был на ключице. Параметры стимуляции: 1,5 мА в течение 12 минут. Вторая группа подверглась плацебо tsDCS. Для генерации ВМО применялась ТМС в “горячей точке” FDI мышцы в M1 (контролировалась при помощи навигационной системы) одиночными импульсами интенсивностью 115% от моторного порога покоя. Эффекты tsDCS оценивались с помощью соотношения ВМО до и после стимуляции (в двух временных интервалах) у обеих групп до, непосредственно после и через 15 минут после tsDCS. Наши данные показывают, что непосредственно после стимуляции происходит уменьшение ВМО, но после 15 минут ВМО увеличиваются, у плацебо стимуляции статистически значимой разницы в изменениях амплитуды ВМО не наблюдалось. Это подтверждается анализом смешанных моделей. Мы предполагаем, что tsDCS индуцирует изменения возбудимости кортико-спинального тракта, тем самым вызывая генерализованные эффекты в головном и спинном мозге. Данное исследование показало, что неинвазивная цервикальная tsDCS может модулировать возбудимость кортико-спинального тракта и, таким образом, вероятно, может оказывать положительное влияние на выработку моторных навыков.

ВЛИЯНИЕ АНОДНОЙ ТРАНССПИНАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ПОСТОЯННЫМ ТОКОМ НА УРОВНЕ ШЕЙНОГО ОТДЕЛА ПОЗВОНОЧНИКА НА ВЫРАБОТКУ НОВЫХ МОТОРНЫХ НАВЫКОВ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

А.В. Попыванова¹, Е.Д. Помелова¹, Н.А. Илюкина¹, М.А. Корякина^{1,2}, Д.О. Бредихин¹, А.Н. Шестакова¹, Е.Д. Благовещенский^{1,2}

¹Центр нейроэкономики и когнитивных исследований, Институт когнитивной нейронауки, НИУ Высшая школа экономики, Москва; ²НМИЦ детской травматологии и ортопедии им. Г.И. Турнера МЗ РФ, Санкт-Петербург

Транспинальная стимуляция постоянным током (tsDCS) представляет собой метод возможного влияния на возбудимость кортико-спинального тракта, тем самым может влиять на выработку моторных навыков у людей. Целью исследования является изучение влияния анодной tsDCS на уровне C7-Th1 спинного мозга на возбудимость кортико-спинального тракта, которую оценивали при помощи вызванных моторных ответов (ВМО) от транскраниальной магнитной стимуляции (ТМС) первичной моторной области коры, а также на выработку новых моторных навыков. В исследовании приняли участие двадцать восемь здоровых человек (возраст 22+/-4 года), которые были разделены на 2 группы. На первой группе проводилась анодная tsDCS, во время сеанса стимулирующий электрод размещали на уровне шейного отдела позвоночника C7, катодный электрод находился на правой ключице. Параметры tsDCS: 1,5 мА в течение 12 минут. Вторую группу подвергали плацебо tsDCS. Во время сеанса стимуляции испытуемые выполняли моторные тесты такие, как критерий оценки ловкости рук: тест с 9 отверстиями (9-НРТ) и задачу на время последовательной реакции (SRT). Анодная tsDCS снижает ВМО после стимуляции и эффект сохраняется минимум 15 минут, чего не происходит при плацебо стимуляции (ВМО остаются на начальном уровне). Данный факт дает возможность предположить, что tsDCS влияет на возбудимость кортико-спинального тракта. В моторных тестах был получен следующий результат: В тесте SRT испытуемые, подвергнутые анодной tsDCS показали такие же результаты, как и испытуемые с плацебо стимуляцией. в тесте 9-НРТ после анодной tsDCS испытуемые, достоверно быстрее выполняли задание на второй день, по сравнению с первым днем обучения, при том, что испытуемые с плацебо tsDCS не показали разницы во времени выполнения задания на второй день. Таким образом мы предполагаем, что анодная tsDCS на уровне C7 влияет на способность человека координировать работу пальцев и своевременно манипулировать предметами (показатель ловкости рук), но не на обучение сопоставлению между положением визуального сигнала и требуемой реакцией. Таким образом наше исследование показывает, что анодная tsDCS модулирует возбудимость кортико-спинального тракта, приводя к улучшению показателей ловкости рук, но не оказывает влияния на обучение зрительно-моторной ассоциации.

ИЗМЕНЕНИЕ ЛЕГОЧНЫХ ОБЪЕМОВ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГАЗООБМЕНА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАННОЙ ЛУННОЙ ГРАВИТАЦИИ

А.А. Пучкова, Д.М. Ставровская, В.П. Катунцев, А.В. Шпаков

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

При подготовке к пилотируемым полетам на Луну к числу первоочередных задач следует отнести необходимость изучения основных факторов медицинского риска, при которых будет осуществляться процесс освоения человеком этого небесного тела. К категории таких малоизученных факторов относится пониженный в 6 раз по отношению к земному уровень лунной гравитации. Целью данного исследования явилось изучение влияния 7-суточного моделирования физиологических эффектов лунной гравитации на показатели внешнего дыхания человека. Работа выполнена на базе НИИ космической медицины ФНКЦ ФМБА России. В исследовании приняло участие 6 практически здоровых мужчин-добровольцев. Моделирование физиологических эффектов лунной гравитации осуществлялось путем перевода человека в ортостатическое положение с углом наклона тела $+9,6^\circ$ по отношению к горизонту с опорной нагрузкой на скелетно-мышечную систему, равной $1/6$ веса тела (Баранов М.В. и др., 2015). Исследование вентилаторной функции легких и газообмена проводили перед началом ортостатической гипокинезии (ОГ) в положении сидя (фон), на 1-е (7 ч ОГ), 3-и и 7-е сутки ОГ с использованием спироэргометрической системы «MetaLyzer 3B» («CORTEX Biophysik»). Полученные результаты дают основание считать, что в условиях моделирования физиологических эффектов лунной гравитации отмечается снижение большинства основных спирометрических параметров (ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ1 и др., кроме РОВд) на 1-е сутки воздействия, не выходящее за пределы нормальных физиологических значений, с тенденцией к их дальнейшему восстановлению. В динамике РОВд отмечены обратные изменения – увеличение значений показателя в первые сутки воздействия с последующим постепенным снижением к окончанию 7-суточной гипокинезии. Величина легочной вентиляции имела тенденцию к снижению. Достоверных изменений показателей потребления кислорода, выделения углекислого газа и дыхательного коэффициента обнаружено не было. При сравнении полученных в первые сутки ОГ данных с данными, полученными в условиях горизонтальной ($n=10$) и антиортостатической гипокинезии с углом наклона тела -6° относительно горизонта как модели физиологических эффектов микрогравитации ($n=6$) такой же продолжительности (7 ч), наблюдали схожие однонаправленные изменения респираторных показателей и показателей газообмена.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ НЕГАТИВНЫМ ПЕРЕСТРОЙКАМ ГРАВИЗАВИСИМЫХ СИСТЕМ ОРГАНИЗМА В ДЛИТЕЛЬНЫХ КОСМИЧЕСКИХ ПОЛЕТАХ

Е.В. Фомина, Н.Ю. Лысова, Н.А. Сенаторова

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Эксперименты в длительных космических полетах позволили получить новые знания о механизмах адаптации человека к условиям невесомости для сохранения физической работоспособности человека в предстоящих межпланетных полетах. В эксперименте приняли участие 11 космонавтов (возраст 44 ± 6 лет), длительность полетов 180 ± 22 суток, у одного космонавта 355 суток. Они выполняли ежедневные двухразовые физические тренировки - одна тренировка на беговой дорожке, вторая с чередованием через день велоэргометра и силового тренажера. Определялась эффективность использования 1) тренировок на дорожке дважды в день в течение 14 дней; 2) трехдневного периода тренировок с использованием компенсатора опорной разгрузки и велоэргометра вместо тренировок на дорожке. Выполнялся локомоторный тест со ступенчато возрастающей нагрузкой (в активном режиме движения полотна дорожки), а также штатный тест МО-3 (в пассивном режиме движения полотна) с регистрацией ЧСС, скорости, пЭМГ, опорных реакций за 30-60 суток до полета, несколько раз в полете и на 8-13-е сутки после полета. Тренировки с компенсатором опорной разгрузки и двухразовые тренировки на дорожке не привели к значимому изменению уровня физической работоспособности. Показано изменение в ответе сердечно-сосудистой системы на физическую нагрузку после тренировок только на велоэргометре - физиологическая стоимость нагрузки снижалась ($p=0,003$). Снижение частоты пЭМГ камбаловидной мышцы и энтропии сигнала при выполнении теста МО-3 в полете свидетельствует о функциональных перестройках, обусловленных сочетанным влиянием пребывания человека в условиях космического полета и эффектов применения средств профилактики негативных влияний невесомости. Уменьшение послеполетных изменений ЭМГ камбаловидной мышцы при выполнении ходьбы зарегистрировано с увеличением времени взаимодействия стопы с опорой во время локомоторной тренировки в полете. Таким образом, в космических экспериментах получены новые знания о роли опорной афферентации в развитии гипогравитационного двигательного синдрома, определена эффективность тренировок с компенсатором опорной разгрузки и велоэргометром, изучены перестройки в системе вегетативного обеспечения мышечной деятельности при длительном пребывании в условиях невесомости. *Работа поддержана базовым финансированием РАН 63.1*

ФИЗИОЛОГИЯ СЕРДЦА

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ В ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ СЕРДЦА

О.Э. Соловьева^{1,2}

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН; ²Уральский федеральный университет, Екатеринбург

Компьютерное моделирование физиологических процессов становится равноправным инструментом фундаментальных исследований в биологии и медицине. *In-silico* исследования на детализированных, хорошо верифицированных компьютерных моделях применяются для дизайна новых лекарств, диагностики и оценки состояния физиологических систем. Успешные примеры применения персонализированных моделей сердца демонстрируют их высокий потенциал для применения в клинической практике. Еще больше возможностей для применения цифровых технологий в биомедицине открывают новые методы анализа данных, включая машинное обучение, нейронные сети, искусственный интеллект. В докладе приводятся примеры сочетанного использования компьютерных моделей сердца и методов искусственного интеллекта в физиологических экспериментах, а также в клинических приложениях. Будут представлены результаты наших исследований, связанных с разработкой популяций компьютерных моделей кардиомиоцитов, которые затем можно применять для изучения механизмов развития и старения сердца, нарушений функции кардиомиоцитов при патологиях сердца, эффектов действия фармакологически активных веществ. В частности, в нашей недавней статье [Parikh et al., *J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 2022] были использованы нейронные сети для создания популяции компьютерных моделей, описывающих экспериментальные данные о действии инотропного препарата омекамтвива мекарбила на сокращение изолированных кардиомиоцитов и предсказывающих механизмы его воздействия. Далее будут представлены результаты применения показателей электрической активации миокарда, рассчитанных на персонализированных моделях желудочков сердца пациентов с ХСН, прошедших имплантацию устройств сердечной ресинхронизирующей терапии (СРТ) в НИМЦ им В.А. Алмазова, для построения прогностической модели успешности терапии для конкретного пациента [Khamzin et al., *Frontiers in Physiology*, 2021]. Обучение классификатора успешности СРТ на гибридном наборе клинических и модельных данных позволило существенно увеличить точность стратификации пациентов по сравнению с существующими клиническими рекомендациями для отбора кандидатов, а также предложить новую технологию для оптимизации расположения электродов при имплантации устройств СРТ. *Работа поддержана грантом РФФ № 19-14-0013.*

УПРАВЛЕНИЕ РИТМОМ СЕРДЦА ПРИ ПОМОЩИ ТЕРМОГЕНЕТИКИ

А.В. Балацкий¹, А.А. Ланин², И.В. Кельмансон^{3,4}, Е.С. Фетисова^{3,4}, В.С. Овечкина^{3,4}, А.А. Можжев^{3,4,5}, С.С. Сабинин⁴, Д. Джэппи¹, А.В. Розов¹, А.М. Желтиков⁶, В.В. Белоусов^{1,3,4}

¹Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва; ³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва;

⁴Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; ⁵ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва; ⁶Texas A&M University, Колледж-Стейшн, США

Нарушения ритма сердца являются значимой медицинской проблемой. Так, при синдроме слабости синусового узла возникают потенциально жизнеугрожающие паузы в работе сердца. Другие нарушения ритма могут приводить к внезапному развитию фибрилляции желудочков и гибели пациентов в течение минут. Наиболее распространенная терапия таких нарушений ритма – установка кардиостимулятора или автоматического кардиовертера-дефибриллятора с имплантацией одного или двух электродов в полости сердца. Однако при этом существует риск перфорации стенки сердца, возникновения эндокардита, тромбозов, дислокации электродов и прочих осложнений. Автоматические кардиовертеры-дефибрилляторы, кроме того, при своём срабатывании генерируют крайне болезненные разряды, что приводит к снижению качества жизни. Одним из подходов к управлению ритмом сердца является оптогенетика, которая предполагает использование белков каналородопсинов, деполяризующих клетки под действием света. Однако каналородопсины не встречаются в организмах млекопитающих и вызывают иммунную реакцию, которая в короткий срок приводит к гибели клеток, экспрессирующих эти белки. Альтернативным подходом является термогенетика – регулирование клеточной активности с использованием термически активируемых каналов суперсемейства TRP (Transient Receptor Potential). Целью настоящей работы являлась разработка термогенетических методов управления ритмом сердца. Для управления ритмом сердца *in vivo* и сокращениями отдельных кардиомиоцитов *in vitro* оптимальными являются человеческие каналы TRPV1. Для их экспрессии в миокарде мышей и в кардиомиоцитах *in vitro* использовались векторы на основе аденоассоциированных вирусов. Показано, что после импульсный нагрев сердца мыши, экспрессирующего TRPV1, при помощи ИК лазера позволяет навязывать ритм с частотой до 7 Гц. Навязывание ритма возможно при нагреве как желудочков, так и предсердий. Электрофизиологические исследования показали, что при нагреве кардиомиоцитов, экспрессирующих TRPV1, возникает входящий ток, величина которого зависит от температуры. Это приводит к деполяризации мембраны и возникновению потенциала действия в ответ на каждый импульс тепла. Таким образом, была продемонстрирована принципиальная возможность создания неинвазивного кардиостимулятора на основе методов термогенетики.

КЛИНИКО-ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ ВЕГЕТАТИВНОГО ГЕНЕЗА

Я.Г. Божко¹, М.В. Архипов¹, Н.С. Марков¹, К.С. Ушенин^{1,2}, К.А. Бутова², Т.А. Мячина², А.Д. Хохлова²,
О.Э. Соловьева² ¹Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ; ²Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

В современной концепции патофизиологии фибрилляции предсердий (ФП) существенное место уделяется автономной дезорганизации (D. Linz et al.). Авторами работы данная проблема была изучена с клинико-экспериментальных позиций от детекции вегетативных изменений при определении профиля вариабельности сердечного ритма (ВСР) у пациентов по данным суточного мониторирования ЭКГ по Холтеру (ХМ-ЭКГ) к поиску формирования субстрата аритмии через изменение динамики цитозольных кальция и магния на уровне изолированных предсердных кардиомиоцитов крысы под действием ацетилхолина, а также соотношений данных электролитов у пациентов и лабораторных животных на уровне форменных элементов крови. Применение методов разведочного анализа данных ХМ-ЭКГ к ВСР пациентов с пароксизмальной формой ФП позволило выделить два фенотипа заболевания – выраженный ваготонический с длительностью ФП до 4.5 часов и умеренный симпатикотонический с длительностью ФП более 4.5 часов. Установлено, что индекс PAF_HTI, рассчитанный на ритме пароксизма ФП, имеет умеренную отрицательную корреляционную взаимосвязь с длительностью изучаемой аритмии ($r=0.60$, $p<0.01$), а до 74% дисперсии индексов ВРС, измеренных на ритме пароксизма ФП в структуре единой записи ХМ-ЭКГ, могут быть объяснены с помощью многопараметрических линейных моделей, включающих по 4 индекса ВРС, рассчитанных на исходном синусовом ритме. В ходе экспериментального исследования методами конфокальной микроскопии было изучено влияние ацетилхолина на изменение динамики цитозольных кальция и магния в кардиомиоцитах левого и правого предсердий крысы с регистрацией укорочения саркомеров в механически ненагруженном режиме сокращения, а в структуре поиска субстрата для развития внутриклеточной дисэлектролитемии было установлено перераспределение магния и кальция в форменных элементах крови, индуцированное ацетилхолином. У пациентов с пароксизмальной ФП вегетативного генеза при анализе электролитного статуса выявлены значимое увеличение кальциево-магниевого индекса внутри форменных элементов за счет увеличения содержания внутриклеточного кальция и существенного снижения магния, при этом содержание внутриклеточного магния имело среднюю отрицательную корреляционную взаимосвязь с частотой возникновения пароксизмов ФП. *Поддержано госзадаaniem УГМУ №121040500248-7.*

ИНКРЕТИНЫ И КАРДИОПРОТЕКЦИЯ: ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ К ПРАКТИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ

М.М. Галагудза *НМИЦ им. В.А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург*

Инкретины представляют собой семейство пептидных гормонов, которые синтезируются в энтероэндокринных клетках тонкой кишки. Важнейшим представителем инкретинов является глюкагоноподобный пептид-1 (ГПП-1). Кроме известных эффектов ГПП-1, связанных с его влиянием на углеводный обмен, в последние годы активно изучаются плейотропные эффекты данного гормона, в т.ч. связанные с защитой миокарда от ишемического-реперфузионного повреждения. Так, известно, что введение ГПП-1 в раннем реперфузионном периоде приводит к уменьшению размера некроза и снижению частоты развития реперфузионных аритмий. В то же время, широкое клиническое применение препаратов ГПП-1 сдерживается высокой стоимостью и низкой стабильностью. В связи с этим усилия исследователей направлены на поиск способов стимуляции эндогенной продукции ГПП-1 энтероэндокринными L-клетками. Одним из подходов к созданию "эндогенного депо" ГПП-1 является выполнение бариатрических (или метаболических) операций, которые, помимо известного вес-снижающего эффекта, демонстрируют эффекты, связанные с компенсацией сахарного диабета 2 типа и снижением кардиоваскулярных осложнений. В нашей работе в экспериментах на крысах показано, что гормональные изменения, индуцированные различными видами бариатрических операций (продольная резекция желудка, гастрощунтирование), сопровождаются уменьшением размера инфаркта и зоны невосстановления кровотока (no-reflow). Эти кардиопротективные эффекты ассоциированы с повышением уровня ГПП-1 и компенсацией сахарного диабета у животных. Таким образом, длительные изменения уровня инкретинов, связанные с выполнением метаболических операций, способствуют уменьшению ишемического-реперфузионного повреждения миокарда. Это явление, по-видимому, может частично объяснять более низкую летальность при остром коронарном синдроме, имеющую место у пациентов, перенесших бариатрические хирургические вмешательства.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СУПЕРОКСИДА И НИТРОКСИДА В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ СЕРДЦА

В.И. Капелько *НМИЦ кардиологии им. Е.И. Чазова, Москва*

Активные формы кислорода принято рассматривать в качестве факторов, индуцирующих окислительный стресс, однако эти формы – супероксид, пероксид водорода, нитроксид - активно используются клетками в качестве вторичных внутриклеточных мессенджеров. Они образуются при каждом сердечном сокращении, но супероксид образуется при возбуждении, а нитроксид – во время сокращения. Обе формы участвуют в регуляции транспорта Ca^{++} - супероксид, окисляя тиоловые группы RyR2 – канала выхода Ca^{++} из саркоплазматического ретикулума (СР), в умеренных дозах увеличивает выход Ca^{++} из СР, а нитроксид через активацию протеинкиназы G фосфорилирует SERCA2 – основной канал поглощения Ca^{++} в СР. Регуляция ритма сокращений сердца посредством активных форм кислорода и азота представляет собой механизм обратной связи, благодаря которому митохондрии и NO-синтазы способствуют поддержанию кальциевого гомеостаза в клетках. Участие нитроксида в регуляции сократительной функции сердца при объемной нагрузке проявляется в увеличении растяжимости миофибрилл. Она обеспечивается посредством фосфорилирования коннектина (титина) – белка, связывающего концы миофибриллярных волокон с границами саркомеров. Фосфорилирование коннектина обеспечивается протеинкиназой G, активируемой цГМФ, образуемого гуанилатциклазой под влиянием нитроксида. При увеличенном растяжении кардиомиоцитов супероксид, образуемый мембранным ферментом NOX2, ускоряет спонтанное высвобождение Ca^{++} из СР, увеличивая активацию

миофибрилл. При недостаточном энергообразовании, вызванном гипоксией, количество образуемого супероксида значительно возрастает из-за нарушения транспорта кислорода по электронно-транспортной цепи, а также повышения активности ксантинооксидазы. В результате канал выхода Ca^{++} RyR2 и канал поглощения SERCA2 окисляются в высокой степени, что уменьшает выход Ca^{++} из SR, а также его поглощение, развивается контрактура миокарда. В этих условиях внешние доноры нитроксида (S-нитрозоглутатион или «Оксаком») через активацию протеинкиназы G способны восстановить транспорт Ca^{++} в SR и восстановить изменённый гипоксией кальциевый сигнал. Инъекция «Оксакома» крысам с доксорубициновой кардиомиопатией ускоряет расслабление и повышает сократимость миокарда, что делает стабильные доноры нитроксида потенциальными кандидатами для терапии.

ИММУННЫЙ ОКСИСТЕРИН В БЕТА-АДРЕНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ

Ю.Г. Одношвикина^{1,2}, А.М. Петров^{1,2}

¹Казанский государственный медицинский университет МЗ РФ, кафедра нормальной физиологии; ²Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань

При воспалительных заболеваниях происходит увеличение продукции 25-гидроксихолестерина (25-ГХ) макрофагами и дендритными клетками. Повышение концентрации 25-ГХ также наблюдается при атеросклерозе и обогащённой жирами диете. Во всех этих случаях увеличивается риск развития сердечно-сосудистых патологий и нарушения бета-адренергической сигнализации. Однако эффекты 25-ГХ на сократимость и ее бета-адренергическую регуляцию не исследованы. Ранее мы обнаружили, что 25-ГХ (в диапазоне 1 нМ-1 мкМ) снижал положительную инотропную реакцию предсердий на агонист бета-АР - изопроterenол (10-100нМ) и ослаблял увеличение Ca^{2+} -транзientа, продукцию NO и рост АФК в этих условиях. Это депрессантное действие 25-ГХ в основном связано с подавлением активности бета-1-адренорецепторов (бета-1-АР). Вероятно, 25-ГХ может угнетать зависимую от бета-1-АР инотропию через пути, сопряженные с другими бета -АР. Целью данного исследования было оценить вклад ингибирующих бета-3-АР в угнетение вызванной изопроterenолом инотропной реакции предсердий при аппликации 25-ГХ. Регистрацию сократимости (Tissue Bath System) проводили на предсердиях белых мышей. Получили, что 25-ГХ утрачивал способность ослаблять инотропный эффект изопроterenола, и вызванное изопроterenолом увеличение продукции АФК при блокировании бета-3-АР с помощью SR (0,1 мкМ) и Gi-белка с помощью инъекции коклюшного токсина. Известно, что $\beta\gamma$ -димер Gi-белка может активировать GRK2/3-киназу, способствуя десенситизации преимущественно бета-1-АР. 25-ГХ также утрачивал депрессантный эффект на вызванную изопроterenолом инотропию при ингибировании GRK2/3-киназы (10mM Smp101). Таким образом, мы предполагаем, что угнетающее действие 25-ГХ опосредуется усилением сигнализации через бета-3-АР и Gi-белок-связанные пути, что способствует десенситизации бета-1-АР. Это может предотвратить избыточную активацию сердца со стороны симпатической системы в условиях воспалительной реакции. Также, вероятно, важную роль в протекции кардиомиоцитов играет снижение продукции АФК под влиянием 25-ГХ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00396, <https://rscf.ru/project/22-25-00396/>

ВЛИЯНИЕ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ НА АРИТМОГЕНЕЗ: МОДЕЛИРОВАНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТ

Р. А. Сюняев^{1,2}, А. В. Пикунов

¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный; ²Сеченовский Университет, Москва

Во время операции коронарного шунтирования у пациентов (n=18) был осуществлен забор ткани ушка правого предсердия. Было выделено 4 группы пациентов: синусовый ритм (1), пароксизмальная (2), персистирующая формы фибрилляции предсердия (3), а также группа пациентов, развивших послеоперационную фибрилляцию предсердий (4). Проведены измерения зависимости формы потенциала действия (ПД) и кальциевых переходов с использованием метода пэтч-кламп и кальций-чувствительных красителей. На основании полученных данных были разработаны пациент-специфичные модели кардиомиоцитов предсердия. Для исследования влияния ремоделирования на клеточном уровне на аритмогенез было проведено трехмерное моделирование распространения возбуждения в ткани предсердий. Для поиска аритмогеноопасных участков по механизму ре-ентри использовался разработанный нами алгоритм, основанный на анализе областей функционального блока и графов активации. Расчеты с использованием моделей кардиомиоцитов пациентов всех 4-х групп показали наличие аритмогеноопасных участков в области легочных вен. Однако пациент-специфичные модели фибрилляции предсердий (группы 2-4) показали наличие большего количества аритмогеноопасных участков, как в правом, так и в левом предсердии. Модель пациентов с персистирующей формой фибрилляции предсердий (группа 3) показала наличие невозбудимых областей в фиброзных участках ткани. Работа выполнена при поддержке РФФ № 22-21-20101.

ВЛИЯНИЕ 7-СУТОЧНОЙ “СУХОЙ” ИММЕРСИИ НА ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОДИНАМИКИ ПРИ ПАССИВНОЙ ОРТОПРОБЕ И ВОЗДЕЙСТВИИ ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ НА НИЖНЮЮ ЧАСТЬ ТЕЛА

Р.Ю. Жедяев¹, О.С. Тарасова^{1,2}, Е.С. Томиловская¹, О.Л. Виноградова^{1,2}, А.С. Боровик¹

¹ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН; ² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Пассивный ортостатический тест (ПОТ) и тест с воздействием отрицательного давления на нижнюю часть тела (ОДНТ) применяются в космической медицине для определения ортостатической устойчивости человека после гравитационной разгрузки (ГР). Оба воздействия вызывают перераспределение крови в нижнюю часть тела, но различаются по вкладу различных рефлекторных механизмов регуляции сердечно-сосудистой системы (ССС), поэтому эффекты ГР на реакции показателей ССС в этих тестах также могут различаться. Однако данные о прямом сравнении эффектов ГР на реакции ССС при ПОТ и ОДНТ к настоящему времени отсутствуют. “Сухая” иммерсия (СИ) является общепринятым способом моделирования

эффектов ГР на ССС. Целью данной работы являлось сопоставление эффектов 7-суточной СИ на регуляторные изменения показателей ССС при ПОТ и ОДНТ у 9 молодых мужчин. Эксперимент был одобрен этической комиссией ГНЦ РФ – ИМБП РАН. За 3 дня до СИ, на 7 день СИ и на 3 день восстановления проводили тестовые сессии с непрерывной регистрацией ЭКГ (для вычисления ЧСС), АД (для вычисления среднего АД в каждом цикле – АДср) и ударного объема сердца (УО). В каждой сессии проводили пять 3-мин ПОТ (65°) и пять 3-мин ОДНТ (-35 мм рт.ст. при горизонтальном положении тела комплексе “Чибиc”, НПП Звезда, Россия) с последующим усреднением параметров. Использование коротких воздействий (3 мин) позволило оценить быстрые изменения в ССС, преимущественно нервной природы и с минимальным вовлечением гормональных систем. На всех сроках тестирования снижение УО (мера ортостатического стресса) было одинаковым при ПОТ и ОДНТ. До СИ реакции ЧСС в двух тестах не различались, АДср не изменялось при ПОТ, но снижалось при ОДНТ. На 7-й день СИ в покое были зарегистрированы снижение УО, повышение ЧСС и АДср, реакции УО и ЧСС при ПОТ и ОДНТ в одинаковой степени возросли. Вместе с тем реакция АДср изменилась только при ПОТ (АДср снижалось), но не при ОДНТ. Показатели ССС и их реакции на ПОТ и ОДНТ восстановились через 3 дня после СИ. Таким образом, 7-суточная СИ ослабляет нервную регуляцию АД при изменении положения тела на вертикальное, вероятно, вследствие недостаточного увеличения сопротивления сосудов нижних конечностей. *Исследование выполнено по Программе фундаментальных научных исследований (64.1) и поддержано РФФИ (№20-015-00536).*

РОЛЬ РЕЗИДЕНТНЫХ ТУЧНЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА В КОНТРОЛЕ РАБОТЫ ПЕЙСМЕКЕРА И ИНДУКЦИИ ПРЕДСЕРДНЫХ АРИТМИЙ

В.С. Кузьмин^{1,2}, И.А. Мальхина^{1,2}, Я.А. Воронина^{1,2}, Л.Р. Горбачева¹

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра физиологии человека и животных; ²НМИЦ кардиологии им. Е.И. Чазова МЗ РФ, лаборатория электрофизиологии сердца, Москва

Целый ряд бактериальных и вирусных инфекций может приводить к системным или локальным провоспалительным ответам, которые, в свою очередь, могут служить причиной нарушения кровообращения. Тяжелая брадикардия и/или брадиаритмии часто являются осложнениями при системных воспалительных реакциях, отягощают гемодинамическую недостаточность. Установлено, что в ткани основного ритмоводителя сердца – синоатриального узла (САУ), присутствуют маркеры иммунокомпетентных клеток, в том числе маркеры тучных клеток. Тем не менее, роль иммунных клеток сердца в контроле его автоматии не исследована. Целью данной работы являлось изучение резидентных тучных клеток сердца как фактора, приводящего к нарушению функционирования САУ и индукции синусовых аритмий при воспалительных реакциях. В ходе работы установлено, что в ткани САУ крыс присутствует значительное количество клеток, содержащих гранулы, окрашиваемые толуидином, и соответственно, потенциально являющиеся тучными клетками. Активация тучных клеток при помощи дегранулятора C48/80 приводит к комплексному изменению пейсмекерной активности в изолированных тканевых препаратах САУ, сопровождаемому изменением длительности и конфигурации потенциалов действия (ПД), скорости медленной диастолической деполяризации. Активация резидентных тучных клеток в тканевых препаратах САУ начально приводит к увеличению площади зоны первичной активации, однако сопровождается миграцией точки первичной активации за пределы САУ в область устья коронарного синуса или полых вен и последующим формированием невозбудимых участков в центральной части синоатриального узла. Наблюдаемая при длительном действии C48/80 функциональная невозбудимость сопровождается блоками проведения возбуждения, подавлением автоматии САУ. В заключении, дегрануляция резидентных тучных клеток в САУ приводит к нарушению способности пейсмекерных кардиомиоцитов спонтанно, ритмически генерировать ПД и вызывает сдвиг зоны доминантного ритмоводителя за пределы центральной части синусового узла, что в совокупности приводит к нарушению нормальной активации предсердного миокарда и брадиаритмиям. Таким образом, активация тучных клеток сердца может рассматриваться как новый механизм, лежащий в основе брадиаритмий, сопровождающих системные провоспалительные реакции.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВАРИАбельНОСТИ ВОЛНОВОЙ СТРУКТУРЫ СЕРДЕЧНОГО РИТМА

Ж.А. Рахимжанова, К.М. Хамчиев, С.С. Ибраева, Ф.М. Сулейменова, А.К. Жиенгалиева, К.Т. Сембекова, А.Е. Сабит
НАО «Медицинский университет Астана», Нур-Султан, Казахстан

Изучение variability сердечного ритма получило широкое распространение в научно-исследовательской, в практической деятельности, в первую очередь с достаточно большой variability абсолютных величин, получаемых при таком анализе, как для совокупной выборки. Целью исследования явилось изучение вероятных причин высокой variability показателей рассчитываемых при анализе ВСР. В исследовании принимали участие студенты с различным уровнем подготовки. Исследования включали кардиограмму, с проведением функциональных проб – активной ортоклиностагической, дыхательной с фиксированным дыханием (5-6 раз в минуту), с задержкой дыхания с использованием аппаратно-диагностического комплекса «Валента». При анализе выявлено значительное влияние психоэмоционального напряжения при первом обследовании и проведении функциональных проб на величину мощности волн в сторону увеличения суммарной мощности и доли волн MB1. При проведении длительных исследований все показатели стабилизировались и индивидуальные различия не превышали 15–20%. Выявлена особенность, что при малой частоте дыхательных движений 9 и менее в минуту часть волн, обусловленная парасимпатическим влиянием (дыхательные волны) фиксируются в спектре медленных волн 2 порядка, так как имеют частоту менее 0,1 Гц. Это связано с тем, что дыхание, так же как и сердечный ритм не является абсолютно стабильным и при частоте дыхания менее 9 раз в минуту некоторые дыхательные акты могут иметь продолжительность более 10 с. Таким образом, выявлены две вероятные причины высокой variability показателей спектрального анализа ВСР, приводимых в различных литературных источниках: влияние волнения и дефектов записи связанных осуществлением некоторых физиологических процессов. При этом выявленные факторы, искажающие волновую характеристику КРГ, отражаются не только на абсолютных, но и на относительных величинах.

РАСЧЕТ ФРАКЦИОННОГО РЕЗЕРВА КРОВотоКА В СЛУЧАЕ МНОЖЕСТВЕННОГО СТЕНОЗА II ТИПА МЕТОДОМ ЛОКАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ

А.Т. Суюндукова¹, С.В. Мельничук¹, В.П. Демкин¹, К.В. Завадовский²

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет; ²Научно-исследовательский институт кардиологии Томского НИМЦ, Томск

По данным Всемирной организации здравоохранения, заболевания сердечно-сосудистой системы занимают лидирующие позиции в причинах смертности населения. Из них 80% приходится на ишемическую болезнь сердца (ИБС). Причиной развития ИБС является стенозирующий атеросклероз коронарных артерий (КА), который ограничивает приток крови к сердцу. В настоящее время активно развивается разработка технологии определения фракционного резерва кровотока (FFR) на основе модели коронарного дерева, полученной при выполнении неинвазивной компьютерно-томографической коронарографии. В основе указанной технологии лежит численный метод Computational Fluid Dynamics Analysis, позволяющий моделировать физиологические процессы, с учетом пространственных характеристик объекта [1]. В случае КА данный алгоритм позволяет установить значение FFR в каждой пространственной точке коронарного дерева. Использование неинвазивных методов определения FFR является востребованным направлением современной медицины. Целью данной работы является разработка математической модели и метода локальной гемодинамики на стенозированном участке КА для оперативной диагностики нарушений кровотока. В данной работе для расчета коронарного кровотока и оценки FFR использована 3D-модель локальной гемодинамики. Математическая модель коронарного потока основана на уравнении Навье-Стокса и уравнении непрерывности, представляющими собой систему дифференциальных уравнений второго порядка в частных производных [2]. Расчеты проведены для правой КА, геометрия которой без стеноза была получена на основании снимков КТ. В работе [3] представлен модельный вариант, в данном исследовании для апробации метода локальной гемодинамики проводилось моделирование нескольких случаев (множественного последовательного и параллельного) стеноза II типа сферической формы. Вычислительный эксперимент показал, что результаты расчетов FFR, основанные на локальной математической модели кровотока в КА хорошо согласуются с результатами более сложных моделей.

Литература

Taylor C.A., Fonte T.A. et al. Computational fluid dynamics applied to cardiac computed tomography for noninvasive quantification of fractional flow reserve: scientific basis. *J Am Coll Cardiol.* 2013. Vol. 61: № 22; P. 2233–41.

Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теоретическая физика: Учебное пособие. Т. VI. Гидродинамика. – М.: Наука. 1986. – 736 с.

ФИЗИОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И ПСИХОФИЗИОЛОГИЯ

ПАРАМЕТРЫ МИКРОДВИЖЕНИЙ ГЛАЗ КАК МАРКЕРЫ АДАПТАЦИИ И РЕАДАПТАЦИИ ПРИ СМЕНЕ УСЛОВИЙ ГРАВИТАЦИИ

И.И. Шошина¹, С.И. Ляпунов², И.С. Зеленская³, И.С. Ляпунов², Е.С. Томиловская³

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; ²Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва; ³ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Визуальное восприятие играет решающую роль в обеспечении мозга информацией, необходимой для принятия решений, построения картины мира и адаптации к изменяющимся условиям. Тремор глаз – мелкие частые колебания глаз. Средняя амплитуда – 20"–40", частота 87 Гц, верхние значения до 250–270 Гц. Это естественный двигательный фон окуломоторной активности, не поддающийся произвольному контролю. Тремор глазных движений наряду с дрейфом характеризует межсаккадические периоды фиксации, время, когда поступает большая часть информации и происходит детальный анализ изображения. Максимальную нагрузку зрительная система испытывает при переходе от гравитации к микрогравитации и обратно, т.е. в так называемые периоды острой адаптации и реадaptации, соответственно. Гипотеза исследования – параметры микротремора глаз являются объективными показателями функционального состояния при смене условий гравитации (гравитация-микрогравитация-гравитация). Регистрировали параметры амплитуды и частоты треморных микродвижений глаз с помощью оптической системы, обеспечивающей высокоскоростную видеосъемку (Ляпунов и др., 2022), в условиях «сухой» иммерсии. Измерения проводили за день до погружения (фон), на 1, 3, 5 и 7 дни СИ, а также на следующий день после окончания эксперимента. Установлено, что на третьи сутки «сухого» погружения происходит значимое изменение амплитуды тремора в широком диапазоне, также как и при переходе из условий микрогравитации к гравитации после окончания погружения. При переходе из условий гравитации к микрогравитации значимость различий для разных диапазонов амплитуды от $p=0,001$ до $p=0,03$, также как и после возвращения из условий микрогравитации к гравитации. Частота тремора глаз оказалась не очень информативным показателем, по сравнению с амплитудой тремора, которой исследователи не уделяли никакого внимания, также как и в целом треморным колебаниям глаз, которые на протяжении почти полувека считались шумом зрительной системы, не играющим существенной роли.

СЛУХОМОТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ РЕЧИ В УСЛОВИЯХ РАЗНЫХ КОММУНИКАТИВНЫХ СЦЕН

И.Г. Андреева¹, А.М. Луничкин¹, А.П. Гвоздева¹, Е.А. Огородникова^{1,2}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН; ²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Слуховой контроль играет ключевую роль в реализации моторных программ голосо- и речеобразования, ответственных за согласованную работу 40 дыхательных, ларингеальных и артикуляторных мышц. На его эффективность оказывают воздействие физиологические факторы, а также акустические условия коммуникации. Шум интенсивностью более 45 дБ над порогом слышимости заметно влияет на работу органов артикуляции, что проявляется в изменении частоты основного тона голоса (ЧОТ), формантной структуры гласных и высокочастотных компонентов спектра ряда согласных звуков речи. В результате нарушения слухового контроля на фоне шумов средней и высокой интенсивности (60–90 дБ) тембр и темп речи диктора меняются. При увеличении расстояния между диктором и слушателем задача управления голосом решается без ухудшения слухового контроля. В этом случае наблюдается произвольное усиление голоса, в отличие от непроизвольного, характерного для речи на фоне шума. Сопоставление двух ситуаций важно для понимания механизмов слухомоторного взаимодействия в условиях разных коммуникативных сцен. В работе исследовали параметры речи у 14 носителей русского языка с нормой слуха и речи, в возрасте 20–34 лет. Записи речи выполняли в тишине и при двух уровнях речеподобного шума, подаваемого в головные телефоны – 60 и 72 дБ. Расстояние между диктором и слушателем составляло 1 или 4 м. Сравнивали характеристики спектра голоса и формантную структуру гласных, которая отражает конфигурацию гортани и ротовой полости, подверженную произвольному и непроизвольному моторному и слуховому контролю. В условиях тишины выявили спектральные изменения голоса диктора при разной коммуникативной дистанции. Речеподобный шум обоих характерных для ситуаций общения уровней вызывал более выраженные изменения параметров речи. При этом роль расстояния была незначительной, а изменения касались не только низкочастотных (ЧОТ), но и высокочастотных компонентов спектра. Результат соответствует проявлениям произвольного усиления голоса при увеличении расстояния до слушателя и непроизвольного изменения динамического диапазона речи и характеристик артикуляции при ухудшении условий слухоречевого взаимодействия. *Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект №22-25-00068).*

НЕЙРОФИЗИОЛОГИЯ ПРЕДИКТИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ И НОСИМЫЕ УСТРОЙСТВА. ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ЗДОРОВЬЮ И ДОЛГОЛЕТИЮ. ПЕРСПЕКТИВЫ, ПРОБЛЕМЫ, ВОЗМОЖНОСТИ

Е.И. Альшанская

НИУ Высшая школа экономики, департамент психологии, нейрофизиологии и когнитивных наук, Москва

Отдельное направление нейрофизиологии связано с долголетием и предиктивной цифровой медициной. На это направлены разработки на ранних стадиях диагностирующие изменения в работе нейромедиаторно-гормонально-иммунной оси работы организма. Эти механизмы являются самым первым этапом прогностической цифровой системы здравоохранения. Эта работа также включена в программу «Приоритет 2030 НИУ ВШЭ». На базе института нейрофизиологии и высшей нервной деятельности РАН. Изучение реакций симпатической (СНС) и парасимпатической (ПНС) нервной системы в зависимо-

сти от уровня стрессовой тревожности для оценки изменений психического здоровья дает нам возможность разрабатывать подходы для создания научно-обоснованных программ долголетия и ментального благополучия населения. Цели исследования - выявить маркеры потенциальных патологических нейродетерминантов, связанных с тревогой и стрессом, приводящих непоправимому разрушению здоровья. Для дальнейшей возможности создания предиктивных моделей для мониторинга стресса и состояния психического здоровья. Во-первых, это «зрелых» технологий сенсоров (с высокой точностью диагностики требуемых показателей, апробированными алгоритмами, проведенными исследованиями) в области носимой электроники. К ним относятся датчики пульса, вариабельности сердечного ритма, частоты сердечных сокращений, пульсоксиметрии, электропроводимости кожи, акселерометры, GPS (для анализа показателей движения), термометры, биоимпеданс, шум, ЭКГ (частичная точность) и дыхания. Во-вторых, новые технологии “средней зрелости” (точность диагностики требуемых показателей в процессе уточнения, клинические исследования в процессе, полевые исследования только запущены) в области и носимой электроники. Носимые, датчики уровня инсулина и глюкозы, давления и гидратации. На настоящий момент неинвазивные и малоинвазивные датчики уровня глюкозы. В-третьих, это фронт технологий. К таким датчикам относятся неинвазивные методы и алгоритмы анализа нейромедиаторов и гормонов. А также разработки датчиков на инновационных материалах, например, графеновые кортизол анализаторы. исследование может быть применено для поиска перспективных маркеров неинвазивного контроля ментального и физического здоровья человека и определения биологического возраста.

ОБРАБОТКА ЛИНГВИСТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ ОТЛИЧАЕТСЯ У ДЕТЕЙ С ОГРАНИЧЕННОЙ ПОДВИЖНОСТЬЮ ВЕРХНЕЙ КОНЕЧНОСТИ И ИХ ЗДОРОВЫХ СВЕРСТНИКОВ

Д. Бредихин¹, О. Агранович², М. Уланов¹, М. Корякина^{1,2}, А. Шестакова¹, Д. Кадиева¹, Г. Копытин¹, Е. Ермолович²,
Б. Бермудез-Маргаретто¹, Ю. Штыров^{1,3}, И. Яскелайнен^{1,4}, Е. Благовещенский^{1,2}

¹Центр нейроэкономики и когнитивных исследований, НИУ Высшая школа экономики, Москва; ²Национальный медицинский исследовательский центр детской травматологии и ортопедии им. Г.И. Турнера МЗ РФ, Санкт-Петербург;

³Центр функциональной интегративной нейронауки (CFIN), кафедра клинической медицины, Орхусский университет, Орхус, Дания; ⁴Лаборатория мозга и разума, кафедра неврологии и биомедицинской инженерии, Университет Аалто, Эспоо, Финляндия

Родовые параличи плечевого сплетения (далее РППС) представляют собой родовую травму, приводящую к ограниченной подвижности верхней конечности детей. Схожие ограничения подвижности наблюдаются у детей, больных амиоплазией, одной из самых популярных форм множественного врожденного артрогрипоза. Несмотря на различную этиологию заболеваний, их объединяет наличие контрактур в крупных суставах, гипоплазия или аплазия мышц, а также проблемы с функционированием двигательных нейронов в передних рогах спинного мозга. Теории воплощенного познания (англ. “embodied cognition”), набирающие популярность в последние годы, могут быть использованы для объяснения нарушений не только в моторной, но и в когнитивной сфере развития у пациентов с подобными двигательными нарушениями. В настоящем исследовании мы провели сравнение нейрональной обработки лингвистической информации среди детей, больных РППС и амиоплазией, а также их здоровыми сверстниками. Для участия в эксперименте, была собрана группа из 27 детей, больных РППС и амиоплазией, и группа здоровых детей аналогичного возраста. В течение записи электроэнцефалограммы, были использованы частые (300 звуков) и редкие (60 звуков) аудиальные стимулы, позволяющие провести регистрацию негативности расогласования (НГ). Серии звуковых стимулов состояли из слов, относящихся к движению рукой, движению ногой, а также псевдослов. В результате, было показано, что параметры НГ отличаются между детьми, больными РППС или амиоплазией, и их здоровыми сверстниками в лобной и височной областях коры головного мозга. Однако, данный эффект наблюдается только в том случае, если воспринимаемые лингвистические стимулы относятся к движению рукой. Именно в таком случае пики НГ были зарегистрированы с задержкой у детей, больных РППС или амиоплазией. Кроме того, у исследуемой группы пациентов амплитуды НГ были снижены во временном кластере, соответствующем типичной задержке пика НГ. Подводя итог, наше исследование показало, что обработка лингвистической информации, связанной с движением рукой, отличается между здоровыми детьми и детьми, больными РППС или амиоплазией. Обнаруженные результаты могут быть использованы для разработки будущих диагностических методов, а также вносят вклад в развитие теорией воплощенного познания.

ВРЕМЕННАЯ ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ ПАМЯТИ: МЭГ ИССЛЕДОВАНИЕ

Е.А. Воеводина¹, А. Бенашур¹, Дж. Галли², М. Феурра¹, Т. Феделе¹

¹Высшая школа экономики, Москва; ²Кингсонский университет, Лондон, Великобритания

Эпизодическая память определяется как запоминание уникальных событий, а также их места и времени. В последнее время исследуется, как активация мозга предсказывает формирование памяти, как во время (онлайн), так и за пределами (офлайн) стимула. Мы провели МЭГ исследование для изучения временной динамики формирования памяти в тета-, альфа- и бета-диапазонах с особым акцентом на активность мозга в течение миллисекунд после предъявления эмоциональных (отрицательных или нейтральных) стимулов. Была использована парадигма последующего запоминания с визуальными стимулами из базы данных IAPS с регистрацией мозговой активности 19 испытуемых. Эксперимент состоял из фазы запоминания, когда участники наблюдали за стимулами и выполняли простую задачу на внимание, и вспоминания, когда участники решали, является ли изображение старым или новым. Участники знали, что их память проверяется, а активность их мозга записывается во время эксперимента. Мы проанализировали поведенческие данные и разделили стимулы на две группы: попадания (правильно запомненные элементы) и промахи (забытые элементы). Записи МЭГ были разделены на эпохи (от -500 мс до 2000 мс, стимул 0-1000 мс) и сгруппированы. Для исследования данных на групповом уровне выполнены частотно-временной анализ и кластерное перестановочное тестирование попаданий и промахов. Модуляция спектральной мощности источника попаданий по сравнению с промахами при запоминании выявила следующие закономерности. В тета-диапазоне синхронизация в лобных и височных областях (0-500 мс) с локализацией в затылочных областях (700-800 мс); десинхронизация

зация в теменно-затылочных долях (500-1500 мс) и в височной и орбитофронтальной области (1100-1900 мс). В альфа-диапазоне десинхронизация, разворачивающаяся в теменно-височных областях (0-250 мс) и фронтально (400-500 мс) и продолжающаяся колебаться в этих областях до 1500 мс. В бета-диапазоне теменная и затылочно-височная десинхронизация с периодическими вспышками лобной активности (0-1100 мс); синхронизация, начинающаяся изнутри и распространяющаяся затылочно (1250-1450 мс), достигающая лобных областей на 1500 мс и остается активной до 2000 мс. Результаты нашего исследования подтверждают идею о том, что как онлайн, так и офлайн активация нейронов во время задания на запоминание способствует успешному формированию следов памяти.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЕПРЕССИИ ПУТЕМ СТЕРЕОТАКСИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В ГИППОКАМП КРЫС

Д.И. Гончар, Д.А. Борозденко

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова МЗ РФ, Москва

В настоящее время известно несколько механизмов развития депрессии: нейротрансмиттерные и/или эндокринные нарушения, воспалительный процесс и др. Существуют валидные протоколы для моделирования депрессии у животных. За 2021 г в библиотеке PubMed опубликовано 250 статей, касающиеся моделирования воспалительных процессов, приводящих к депрессии, но валидная нейровоспалительная модель депрессии без развития системного воспаления до настоящего времени отсутствует. Цель исследования: валидация методики моделирования депрессивного состояния путем стереотаксического введения липополисахарида в гиппокамп крыс. В эксперименте использовали крыс-самцов Wistar (n=20). Животные были разделены на 3 равные по активности и весу группы: 1 – модельная с введением ЛПС, 2 – ложнопериоперированная, 3 – интактная. Моделировали депрессию методом стереотаксического введения ЛПС в гиппокамп; 3,5 мкл раствора 50 мкг/крыса по координатам AP -3, ML 2, DV 3. Депрессивное состояние оценивали в тестах норковая камера, открытое поле, тест Porsolt, приподнято-крестообразный лабиринт (ПКЛ). Для сравнения групп был проведен двухфакторный ANOVA тест с уровнем значимости 5%. Системное воспаление оценивали, измеряя С-реактивный белок в плазме. В тесте норковая камера отмечалось достоверное снижение вертикальной активности у модельных крыс в сравнении с интактными. В тесте открытое поле – достоверное снижение двигательной активности (пересечение секторов, стоек) у модельных животных. В тесте Porsolt статистически значимо увеличивалось время неподвижности у крыс с ЛПС в сравнении с ложнопериоперированными и интактными (5.22±2.14 vs 3.72±1.77 vs 6.46±0.79). В тесте ПКЛ животные с депрессивным поведением статистически значимо меньше находились в открытых рукавах, что говорит о повышенном уровне тревожности. Отмечается общее уменьшение исследовательской активности. Биохимический анализ крови не выявил различий между группами по концентрации СРБ. В исследовании показано, что метод введения ЛПС в гиппокамп животных, формирует стойкое депрессивное поведение, не вызывая системного воспаления у модельных животных, снижается ориентировочно-исследовательская активность, повышается тревожность. *Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-73-220250).*

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ МОДЕЛИРОВАНИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА ПУТЕМ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ МФТП В ГИППОКАМП КРЫС

В.И. Богородова¹, А.Г. Королев²

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова; ²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

В связи с увеличением средней продолжительности жизни человека нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Паркинсона, становятся все более актуальной проблемой. Для ее решения необходимы многочисленные доклинические исследования на животных. Одной из классических моделей болезни Паркинсона на животных является введение нейротоксина МФТП, но строение гематоэнцефалического барьера у крыс, делает невозможным внутривенное введение токсина, а стереотаксический метода сложен в исполнении. При интраназальном введении вещество минует ГЭБ, а анатомически близкое расположение обонятельных луковиц и нигростриальной области делает это метод введения перспективным в моделировании паркинсонизма у крыс. Цель исследования. Валидация методики моделирования болезни Паркинсона путем интраназального введения МФТП. В эксперименте использовали крыс-самцов Wistar (n=20). Животные были разделены на 2 равные по активности и весу группы: 1 – модельная с введением МФТП, 2 – с введением физ раствора. Для моделирования болезни Паркинсона, крысам под общей анестезией (золетил + ксилазин) вводили в каждую ноздрю по 25 мкл 0,1 мг МФТП. Симптомы болезни Паркинсона оценивали в моторных и поведенческих тестах: норковая камера, открытое поле, сужающаяся дорожка, тест цилиндра. Для сравнения групп был проведен двухфакторный ANOVA тест с уровнем значимости 5%. Для подтверждения гибели нейронов в черной субстанции проводили иммуногистохимическое окрашивание на тирозингидроксилазу.

В тесте норковой камеры и открытого поля отмечалось достоверное увеличение горизонтальной активности и увеличение времени неподвижности у модельных животных. В тесте сужающейся дорожки у модельных крыс отмечался моторный дефицит на задние лапы. По результатам иммуногистохимического исследования в черной субстанции у крыс под воздействием МФТП достоверно сокращалось количество нейронов. В исследовании показано, что метод интраназального введения МФТП, формирует клинические проявления болезни Паркинсона, увеличивая бессистемную двигательную активность, нарушая локомоторную функцию. Метод моделирования может быть использован в доклинических исследованиях. *Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания № АААА-А18-118051590108-1.*

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ МОДЕЛИРОВАНИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА СТЕРЕОТАКСИЧЕСКИМ ВВЕДЕНИЕМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В ЧЕРНУЮ СУБСТАНЦИЮ У КРЫС

Д.Н. Ляхман, В.И. Богородова, Н.М. Киселева, В.В. Негребецкий

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва

Болезнь Паркинсона является вторичным нейродегенеративным заболеванием, связанным с нарушением дофаминергической нервной передачи, часто обусловленное воспалительным процессом, которое встречается почти у 200 человек на 100 тыс. населения. Моделирование болезни Паркинсона на лабораторных животных является одной из ключевых стадий создания новых лекарственных препаратов для лечения данной патологии. Поэтому задача по валидированию метода введения липополисахарида, как активного провоспалительного агента в черную субстанцию для моделирования болезни Паркинсона у лабораторных животных является актуальной. Цель исследования. Валидация методики моделирования болезни Паркинсона путем стереотаксического введения липополисахарида (ЛПС) в черную субстанцию крыс. Материалы и методы. В эксперименте использовали крыс-самцов Wistar (n=14). Животные были разделены на 3 равные по активности и весу группы: 1 – модельные животные, 2 – ложнопериоперированные, 3 – интактные. Моделировали болезнь Паркинсона методом стереотаксического введения ЛПС 2,0 мл раствора 10 мкг/крыса по координатам AP -5,5, ML 2, DV 8. Поведение животных оценивали в тестах открытое поле, «цилиндр», приподнято-крестообразный лабиринт (ПКЛ). Для сравнения групп был проведен двухфакторный ANOVA тест с уровнем значимости 5%. Результаты. В открытом поле выявлено статистически значимое снижение двигательной активности (пересечение секторов, стоек) модельных и интактных крыс. В тесте «цилиндр» значительно уменьшается процент использования ипсилатеральной передней конечности в сравнении с ложнопериоперированными (47.67% ± 1.74%, 50.67% ± 1.17%). В тесте ПКЛ модельные животные значительно меньше находились в открытых рукавах. Отмечается общее уменьшение исследовательской активности (выглядывания, свешивания). Вывод. В исследовании выявлено, что метод введения ЛПС в черную субстанцию животных способен привести к моделированию болезни Паркинсона у крыс. У модельных животных снижается ориентировочно-исследовательская активность, изменяется приоритет использования передних конечностей. Полученные данные свидетельствуют о возможностях данного метода воссоздавать воспалительный генез болезни Паркинсона у крыс. *Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания № АААА-А18-118051590108-1.*

Val/Met ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ВЛИЯЕТ НА ФОНОВУЮ ЭЭГ АКТИВНОСТЬ МОЗГА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПАМЯТИ В ПОЖИЛОМ ВОЗРАСТЕ

Н.В. Вольф, Е.Ю. Приводнова

НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

Анализ когнитивного старения показывает значительную гетерогенность этого процесса, что объясняется влиянием как генетических, так и средовых факторов. BDNF (brain-derived neurotrophic factor) является нейротропным фактором, вовлеченным в процессы пластичности мозга. Val/Met полиморфизм является функциональным полиморфизмом гена BDNF, что обуславливает его ассоциации с архитектурой и функциями мозга и эффективностью когнитивных функций. Задачей настоящего исследования было выявить связанные со старением особенности взаимосвязей между Val/Met полиморфизмом и эффективностью процессов вербальной памяти, определяемой в дихотическом тесте, а также с фоновой осцилляторной активностью мозга, регистрируемой при закрытых глазах в 60 ЭЭГ отведениях. В исследовании участвовали 235 праворуких европеоидов молодого (средний возраст 21,65 лет, SD = 3,18) и 141 пожилого возраста (64,37 лет, SD = 6,04). Генетические различия в показателях памяти и эндофенотипах ЭЭГ активности выявлены только у лиц пожилого возраста. При дихотическом тестировании пожилые испытуемые с генотипом Val/Val воспроизводили меньше слов с правого уха по сравнению с носителями Met аллеля. При анализе ЭЭГ генетические различия обнаружены в фокальных показателях асимметрии мощности дельта, тета, бета 1 и 2 ритмов, и были обусловлены большей мощностью ритмов в центрально-темпоральных отделах правого по сравнению с левым полушарием у Val/Val при обратном соотношении у носителей Met аллеля. Для бета 2 ритма аналогичные различия в асимметрии были характерны также для париетально-окципитальных областей полушарий. У пожилых испытуемых для всех ритмов обнаружены достоверные положительные корреляции между показателями центрально-темпоральной асимметрии (мощность в левом полушарии - мощность в правом) и количеством слов, запомненных с правого уха. Полученные данные впервые показывают возрастные различия в эффектах Val/Met полиморфизма BDNF в отношении эффективности вербальной памяти и мощности ЭЭГ и указывают на возможные взаимосвязи между этими ассоциированными с генотипом параметрами. *Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (тема № 122042700001-9).*

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА Val66Met НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГОЛОВНОГО МОЗГА С ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЧАСТОТОЙ ПИКА И МОЩНОСТЬЮ АЛЬФА РИТМА ЭЭГ У ВЗРОСЛЫХ ИСПЫТУЕМЫХ

Е.Ю. Приводнова^{1,2}, Н.В. Вольф^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины; ²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Однонуклеотидный полиморфизм в гене BDNF (Val66Met) регулирует зависимость от активности секрецию нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), который влияет на нейропротекцию и регуляцию синаптической пластичности. В ряде работ Met-аллель был ассоциирован с более низкими значениями мощности альфа ритма ЭЭГ, определенного в стандартном частотном диапазоне. Наряду с мощностью, одним из наследуемых ЭЭГ коррелятов функционирования мозга является индивидуальный пик частоты альфа ритма (ИПЧА), измеряемый частотой, показывающей наибольшую мощность. Хотя ИПЧА имеет самостоятельное функциональное значение, его ассоциации с полиморфизмом Val66Met BDNF не изучены. ИПЧА используется также для определения границ индивидуальных частотных диапазонов, которые, в отличие от стандарт-

ных, более соответствуют функциональным характеристиками ритмов. Мы проверили на выборке из 186 испытуемых в возрасте 18–78 лет, ассоциирован ли ИЧПА с полиморфизмом BDNF и протестировали генотипические различия в альфа мощности, рассчитанной в стандартных и индивидуальных частотных диапазонах. Под контролем возраста и пола у Val/Met выявлено снижение ИЧПА по сравнению с Val/Val и повышение мощности по сравнению с гомозиготными генотипами. Снижение мощности альфа ритма у Met/Met по сравнению с Val-носителями повторяет предыдущие результаты и может говорить о повышенной возбудимости коры. Однако, в отличие от открытых глаз, генетические различия при закрытых глазах проявляются только для данных, полученных в индивидуальном диапазоне, что может быть обусловлено сдвигом функционального диапазона альфа ритма в область низких частот среди носителей Val/Met, показавшим снижение ИЧПА. Результаты свидетельствуют, что включение Met/Met в объединенную группу Met-носителей при анализе активности мозга может нивелировать различия между Val/Val и Val/Met генотипами, а также преимущество использования индивидуальных частотных диапазонов при анализе ассоциированных с BDNF особенностей электрофизиологической активности мозга. *Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (тема № 122042700001-9).*

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ РАЗВИТИЕМ РЕЧИ И КОГНИТИВНЫМ РАЗВИТИЕМ У ДЕТЕЙ С НАРУШЕНИЯМИ ВЕРХНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ (АРТРОГРИПОЗ)

М.М. Корякина, Е.Д. Благовещенский, О.Е. Агранович, З.Е. Агранович

НМИЦ детской травматологии и ортопедии им. Г.И. Турнера, Санкт-Петербург

В настоящем исследовании рассматриваются особенности взаимосвязи речевого развития и когнитивных функций у детей с нарушениями верхних конечностей. Согласно предыдущим исследованиям, двигательная дисфункция верхних конечностей нарушает когнитивные функции, особенно слуховую и зрительную память, и взаимосвязь между когнитивными навыками и двигательными нарушениями особенно очевидна в возрасте от 8 до 10 лет. В исследовании приняла участие группа из 29 детей (14 девочек) в возрасте 7-15 лет (среднее = 10,3 у.о., +/-2,3) с двигательными нарушениями верхних конечностей (с АМК и ОБПЛ) Эти дети имеют следующую общую патологию в соответствии с ортопедической классификацией: у них присутствуют контрактуры в крупных суставах, гипоплазия или аплазия мышц, а также признаки проблем с мотонейронами в передних рогах спинного мозга. Мышцы верхних конечностей гипопластичны или отсутствуют. Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием процедуры Бонферрони был проведен для оценки средних различий в показателях объема внимания и памяти, для группы уровней речевых расстройств. При N=29 детей в 4 категориях соотношение средних квадратов данных является высоко статистически значимым ($F=11.80$, $df=3$ и 44 , $p<0.000$). Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что группы имеют одинаковый средний уровень внимания и памяти. Ситуация была идентичной с уровнем концептуального развития. Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием процедуры Бонферрони также был проведен для оценки средних различий в концептуальном развитии для группы уровней речевых нарушений. Анализ показал статистически значимую связь между уровнем когнитивного развития и речевыми расстройствами. Т.е. группа детей с отсутствием речевых нарушений имеет более высокие показатели по шкалам объем слухового внимания, объем слуховой памяти, объем визуальной произвольной памяти и уровень концептуального развития. При этом результаты всех групп были ниже, чем средние возрастные нормы для данных тестов. Поиск отличий в развитии детей с двигательными нарушениями от здоровых детей, а также поиск возможных взаимосвязей между когнитивными и речевыми функциями необходим для проведения психологических и логопедических вмешательств на ранних стадиях развития этих детей.

РЕГИСТРАЦИЯ ХЛОРНОЙ ПРОВОДИМОСТИ НЕОКОРТИКАЛЬНОГО НЕЙРОНА КАК МЕТОД ОПИСАНИЯ ФУНКЦИИ ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫСЫ *IN VIVO*

В.Р. Ситдикова¹, В.М. Силаева¹, В.В. Шумкова¹, М.Г. Минлебаев^{1,2}

¹НИЛ "Нейробиология развития", Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань; ²Средиземноморский институт нейробиологии при Национальном институте здоровья и медицинских исследований, Марсель, Франция.

Эпилепсия – одно из наиболее распространенных заболеваний нервной системы, характеризующееся повторяющейся пароксизмальной активностью нейронов, вызванной повышенной гиперсинхронной активностью в кортикальной сети. Исследования *in vitro* продемонстрировали увеличение внутриклеточной концентрации ионов хлора во время эпилептиформной активности, что могло бы привести к изменению полярности функции ГАМК с ингибирующей на возбуждающую. Но остается открытым вопрос, изменяет ли ГАМК свою полярность во время эпилептиформной активности *in vivo*. Чтобы ответить на этот вопрос, мы охарактеризовали внутриклеточную концентрацию ионов хлора во время эпилептиформной активности, используя методику регистрации одиночных каналов и локального потенциала у взрослых крыс линии Wistar *in vivo*. С помощью уравнения Гольдмана-Ходжкина-Каца были рассчитаны мембранный потенциал покоя клетки и потенциал реверсии ГАМКа тока как в контроле, так и в условиях эпилептиформной активности, вызванной 4-аминопиридином (100 мМ). Наши предварительные результаты показали, что во время эпилептиформной активности мембранный потенциал покоя нейронов сдвигался в сторону деполяризации ($-39,4 \pm 7,07$ мВ, в то время как в контроле $-72,06 \pm 5,04$ мВ). Деполяризующий сдвиг также наблюдался для ГАМКа активируемого тока (потенциал реверсии сместился с $-77,4 \pm 5,16$ мВ в контроле до $-42,02 \pm 6,53$ мВ во время эпилептиформной активности). Несмотря на сдвиг потенциала реверсии ГАМКа, он все еще оставался более отрицательным по сравнению с мембранным потенциалом покоя, что означает, что ГАМК служила гиперполяризующим и ингибирующим нейротрансмиттером во время эпилептиформной активности *in vivo*. Необходимы дальнейшие исследования для увеличения количества зарегистрированных клеток и выяснения механизмов, лежащих в основе увеличения внутриклеточной концентрации ионов хлора. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-25-00225.*

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОНАНОСИСТЕМ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

ТЕНДЕНЦИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ РАБОТЫ МОЗГА

В.А. Олейников^{1,2,4}, Д.О. Соловьева¹, А.В. Попов¹, О.И. Сулягина¹, А.Б. Тяглик¹, К.И. Морозова³, А.А. Федотова¹,
М.С. Шестопалова¹, А.В. Залыгин^{1,2}, А.В. Семьянов¹, Н.А. Браже³, М.В. Третьяк¹, К.Е. Мочалов¹

¹ИБХ РАН, Москва; ²ИФИБ НИЯУ МИФИ, Москва; ³МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва;

⁴Университет ИТМО, Санкт-Петербург

Под корреляционной микроскопией понимают объединение в одном устройстве нескольких методов, позволяющих для данного конкретного образца решить три задачи: (1) получение структурных (топографических, морфологических) данных с высоким(сверхвысоким)разрешением, (2) получением информации о химической природе объектов, находящихся в каждой локальной области, и (3) реконструкция трехмерных распределений, получаемых при реализации подходов (1) и (2). Корреляционная микроскопия идеально подходит для исследования процессов, протекающих в мозге, для которых важным является получение 3D информации. Реализуются два взаимодополняющих подхода: (1) получение информации от фиксированных образцов (заморозка, фиксация в смолах), и (2) сканирование живых объектов (доживающие клетки, живые организмы). Преимуществами первого, является возможность использования таких высокоразрешающих методов, как электронная просвечивающая или зондовая сканирующая микроскопия, микроспектральные методы ближнего поля и ультрамикротомография. В целом, этот комплекс методов позволяет получать детальную информацию о структуре образца с разрешением нанометрового диапазона, химическом составе каждой точки образца, о распределении физико-химических параметров по объему образца. Однако, для получения динамических параметров объекта приходится прибегать к опосредованным методам. Другой подход, основанный на использовании оптических методов, позволяет следить за динамикой изменения состояния объекта, например, совмещая методы конфокальной флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния света. В настоящей работе рассмотрены пути совмещения данных, получаемых этими методами. Рассмотрены пути сопоставления данных, получаемых методами электронной и сканирующей зондовой микроскопии. Приводятся примеры получения и интерпретации спектральных данных о функционировании живых организмов, в частности, тканей живого мозга (на мышинных моделях), полученные методами флуоресцентной и КР спектроскопии. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-14-00168.*

СЕНСИБИЛИЗАТОРЫ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ДЛЯ ФОТО- И СОНОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

А. Орлова, В. Маслов, А. Дададжанова, Е. Смирнова *Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

Идея неинвазивного метода разрушения опухолей в клинической практике сегодня реализована с помощью метода фотодинамической терапии (ФДТ), основанного на комбинированном действии электромагнитного излучения видимого диапазона и молекулярных сенсibilизаторов активных форм кислорода (АФК). Несмотря на очевидные преимущества ФДТ в сравнении с химиотерапией, радиотерапией и хирургическим вмешательством, сегодня метод ФДТ в большинстве случаев рассматривается в качестве вспомогательного. В первую очередь это обусловлено ограниченной глубиной проникновения электромагнитного излучения в ткани. Поиски альтернативных источников энергии возбуждения для активации сенсibilизаторов АФК привели к появлению нового неинвазивного метода, сонодинамической терапии (СДТ), в котором сочетание низкоинтенсивного ультразвукового излучения с частотой 20 кГц–3МГц с сенсibilизаторами АФК используется для деструкции злокачественных новообразований. В работе исследована эффективность генерации АФК молекулярными и наноструктурированными сенсibilизаторами под действием ультразвукового излучения с частотой 20 кГц. Показано, что наличие в образцах нелюминесцирующих агрегатов феофорбида а в смеси с мономерами феофорбида а приводит к увеличению эффективности генерации синглетного кислорода, гидроксильного радикала и супер-оксид аниона, по сравнению с раствором мономеров феофорбида а. Установлено, что в случае наноструктурированных сенсibilизаторов АФК, нанокомпозитов типа ядро/оболочка на основе квантовых точек Ag-In-S₂ и наноструктурированной оболочки TiO₂ генерация АФК под действием ультразвукового излучения на порядок менее эффективна чем под действием электромагнитного излучения с аналогичной плотностью мощности (порядка 3 мВт/см²). Продемонстрирован выраженный СДТ эффект на клетках меланомы при кратковременном (10 секунд) комбинированном воздействии низкоинтенсивного (83 мВт/см²) ультразвукового излучения с частотой 20 кГц и хлорина еб, молекулярного сенсibilизатора АФК. Показано, что величина СДТ эффекта на клетках меланомы сопоставима с величиной ФДТ эффекта. Полученные в работе данные наглядно демонстрируют перспективность развития методов сонодинамической терапии с использованием молекулярных и наноструктурированных сенсibilизаторов АФК.

ОЦЕНКА ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА С ПРИМЕНЕНИЕМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО АППАРАТА НЕЧЕТКОЙ ЛОГИКИ

А.О. Цибулина¹, О.В. Демкин¹, Л.Ю. Котловская^{1,2} ¹Национальный исследовательский Томский государственный университет; ²НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томск

Расстройства системы гемостаза, приводят к изменению вязкоупругих свойств крови, что приводит к возникновению тромбогеморрагических осложнений. Это обуславливает необходимость получения новых знаний о свертываемости крови, а также разработке новых методов исследования и модификации уже имеющихся алгоритмов. Целостное представление о функционировании системы гемостаза можно получить только при анализе результатов глобальных тестов коагуляции. При проведении измерений на начальной фазе гемокоагуляции часто приходится сталкиваться с фрагментарностью и неполнотой информации, которая может приводить к снижению достоверности врачебного заключения. Устранить эту проблему можно

за счет применения адаптивных нечетких систем, где подбор параметров будет производиться автоматически в процессе обучения системы. Наши исследования гемостатического потенциала основаны на данных метода низкочастотной пьезотромбоэластографии, поскольку этот метод позволяет получить информацию на всех этапах цикла коагуляции. В данной работе было проведено исследование динамики вязкоупругих свойств крови для различных клинических ситуаций. При анализе полученных зависимостей были выявлены пограничные случаи, при которых возможна неверная постановка диагноза. Для того, чтобы устранить эту проблему был применен метод нечеткой логики, включающий отбор наиболее статистически значимых параметров, влияющих на свертываемость крови. В качестве входного набора при нечетком моделировании были выбраны следующие начальные данные: концентрации фибриногена и протромбина, время начала генерации тромбина, время достижения максимума концентрации тромбина, скорость нарастания тромбина и эффективное время наработки тромбина. Для определения нечеткого значения выходной переменной «Гемостатический потенциал» была сформирована база логических правил. Расчеты проводились при использовании программного пакета MATLAB 2015b, модуль FUZZY LOGIC TOOLBOX.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ЛАЗЕРНОГО СИНТЕЗА НАНОЧАСТИЦ ПОРИСТОГО КРЕМНИЯ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

М.С. Григорьева^{1,2}, А.А. Григорьев^{1,2}, И.Н. Завестовская^{1,2}, А.П. Канавин^{1,2}, В.Ю. Тимошенко^{1,2,3}, А.Ю. Харин¹

¹Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; ²Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН;

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

Актуальность исследования взаимодействия лазерного излучения с пористым кремнием (ПК) определяется ростом в последнее десятилетие применения наноструктур ПК в различных областях биомедицины, что связано с его уникальными оптическими и теплофизическими свойствами, биосовместимостью, биодеградированностью и др. Из-за большой практической значимости лазерно-структурированных кремниевых подложек, а также наночастиц кремния, полученных при лазерной абляции, моделированию данных процессов посвящено большое количество. Однако до настоящего времени моделирование описывает взаимодействие излучения с монокристаллической подложкой, в то время как особый интерес для синтеза может представлять взаимодействие с подложкой ПК. В работе исследованы процессы нагрева и плавления ПК под действием падающего лазерного излучения на основе модели эффективной среды, а также проведено моделирование процесса абляции пленок ПК при облучении коротковолновыми лазерными импульсами с учетом однофотонного поглощения. Процесс лазерного нагрева слоя ПК лазерными импульсами не длительности рассматривался в рамках тепловой модели. В расчетах была учтена зависимость теплофизических и оптических величин кремния от его пористости. Получена аналитическая зависимость порога плавления ПК от его пористости. В результате проведенных расчетов установлено, что порог плавления ПК при воздействии лазерных импульсов резко снижается с ростом пористости материала. Для определения общих закономерностей по изменению порога лазерной абляции ПК методом молекулярной динамики проведено моделирование процесса абляции пленок ПК с размером пор 1-3 нм различной степени пористости при воздействии на них лазерного излучения различной длины волны и мощности. Обнаружено значительное снижение порога абляции для пористых образцов. Причем порог абляции падает с увеличением пористости и слабо зависит от размера пор. На основании проведенных исследований можно говорить о том, что порог лазерной абляции при синтезе кремниевых наночастиц может быть снижен за счет использования пористых подложек, что может привести к удешевлению лазерно-абляционного синтеза и существенному снижению требований к оборудованию при проведении лазерной абляции. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-02-00861.*

СПЕКТРОСКОПИЯ МАГНИТНОГО КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА СУПЕРПАРАМАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА

Д. Клименко, А. Матюшкина, Е. Колесова, В. Маслов, А. Орлова *Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (SPIONs) и композиты на их основе благодаря своим уникальным свойствам являются перспективным материалом для биомедицинских применений, в частности, актуальны исследования использования SPIONs для терапии злокачественных новообразований методом локальной гипертермии, а также для адресной доставки лекарственных препаратов. Для SPIONs характерна высокая чувствительность к воздействию окружающей среды: в аэробных условиях магнетит является метастабильным состоянием, т.к. окисление ионов Fe^{2+} превращает его в маггемит, который характеризуется существенно более низкой величиной намагниченности насыщения. Именно поэтому появляется необходимость точного контроля структуры и свойств используемого магнитного материала для конкретных областей применения. В работе проведен анализ спектров магнитного кругового дихроизма сферических и кубических МНЧ оксида железа. Установлено, что спектры МКД SPIONs являются линейной комбинацией спектров МКД магнетита и маггемита. Продемонстрировано, что данный подход позволяет оценить объемное отношение маггемита и магнетита в исследуемых образцах. Показано, что соотношение магнетита и маггемита в наночастицах оксида железа зависит от размера, формы и возраста образцов. Спектральные зависимости амплитуд двух компонент показали, что все анализируемые образцы окислены в различной степени. Установлено, что группа полос в спектрах МКД образцов SPIONs в области 300 – 400 нм, ранее приписываемая в литературе электронным переходам в магнетите, относится к маггемиту и, предположительно, связаны с электронными переходами переноса заряда лиганд-металл с участием поверхностных атомов кислорода.

Результаты работы наглядно демонстрируют, что спектроскопия магнитного кругового дихроизма является чувствительным инструментом для определения отношения фаз магнетита и маггемита в образцах наночастиц оксидов железа, которое является определяющим для эффективности их применения в биомедицинских приложениях. *Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, госзадание №. 2019-1080.*

МУЛЬТИМОДАЛЬНЫЙ СЕНСОР ОДИНОЧНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ЭЛАСТИЧНОЙ НАНОТРУБКИ

К.А. Иванова^{1,2}, П.В. Башкиров¹ ¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва; ²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

Биосенсоры, созданные на основе нанопор, имеют большой потенциал для детектирования и исследования одиночных макромолекул, попадающих в канал нанопоры, благодаря высокой разрешающей способности и простоте измерения скачков ионного тока, вызванных частичным перекрытием ее просвета. Анализ характерной формы и длительности сигнала позволяет различать молекулы между собой по значениям их размера, дипольного момента, полного заряда, а также коэффициента вращательной диффузии. В данной работе мы исследуем возможность использования цилиндрической липидной нанотрубки (НТ) в качестве мультимодального сенсора, в котором благодаря упругости стенки НТ становится возможным регистрация сигналов не только от молекулы, проходящей внутри канала НТ, но и от локальной деформации формы НТ, вызванной адсорбцией одиночной молекулы белка на ее наружной поверхности. С целью определения возможности достоверно регистрировать изменения ионной проводимости просвета липидной НТ, характерные для одиночных молекул, мы провели параметрическое исследование шума измеряемого ионного тока и его зависимости от геометрических параметров НТ, концентрации ионов, ширины полосы пропускания сигнала. Анализируя низкочастотные характеристики шума, мы смогли определить значение константы Хуга для $1/f$ шума, которая оказалась равной 3×10^{-3} , на порядок больше, чем в твердотельных аналогах. При увеличении ионной силы электролита и уменьшении длины НТ мощность высокочастотного шума приближается к фундаментальному тепловому шуму. Теоретические оценки и экспериментальные наблюдения показали, что несмотря на большой $1/f$ шум, адсорбция одиночных молекул на поверхности НТ может быть разрешена при соответствующим образом подобранных геометрических параметров НТ. Также нами предложен подход, позволяющий управлять переносом и детектировать прохождение одиночной молекулы внутри НТ. Показано, что регистрация отдельных событий становится возможной при совпадении поперечных размеров просвета НТ и радиуса гирации белка. Таким образом мы заключаем, что эластичные свойства липидного бислоя, значительно расширяют функциональность созданного на основе липидных НТ сенсора по сравнению с твердотельными нанопорами. *Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-15-00265.*

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи

3–8 октября 2022

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абаимов Д.А. 34
Абакумов М.А. 61, 63
Абдурахманова М.М. 65
Абрикосова В.А. 16
Абу Шели Н.М.А. 107
Абушинова Г. 74
Авдеева М.А. 107
Авдонин П.В. 89
Авдошина Д.В. 59
Агапов А.А. 23
Агапов М.А. 98
Агафонов М.О. 61, 77
Агеева М.В. 55
Агранович З.Е. 120
Агранович О. 117
Агранович О.Е. 107, 120
Акулова Н.И. 51
Александров А.И. 28, 61
Александрова А.Ю. 98
Александрова Л.А. 61
Алексеева В.С. 100
Алексеева И.В. 23
Алексеев И.В. 66
Алешин В.А. 10
Алиева И.Б. 89
Аллахвердиев С.И. 47
Альшанская Е.И. 116
Амирова Л.Е. 107
Андреева А.Ю. 102
Андреева Е.А. 27
Андреева И.Г. 116
Андреева Л.А. 8
Антонян Б.Г. 92
Антропова И.П. 95
Ануфриев К.Э. 41
Ануфриева К.С. 27, 30, 32, 34, 35, 37
Апт А.С. 73
Арапиди Г.П. 4, 27, 29, 30, 32, 34–38, 57
Арасланова К.Р. 96
Арбатский Н.П. 49, 56
Аржанова Е.Л. 51
Арзуманян В.А. 62
Арсеньев А.С. 7
Артохов А.В. 10
Артюшин И.В. 58
Архипов М.В. 112
Бабаков А.В. 17
Байдакова Г.В. 81
Байчурина И.А. 39
Бакман А.С. 23
Бакшеева В.Е. 80
Балацкий А.В. 111
Балацкий А.В. 72
Балашов Н.В. 46
Балашова Е.Е. 34
Балобанов В.А. 5
Банникова А.Е. 79
Баранов В.М. 104
Баранов М.С. 6
Баранова М.Н. 4, 6
Баранова С.В. 5, 18
Баранчиков А.Е. 45
Барковская М.Ш. 51
Барлев Н.А. 64
Барсегян А.М. 43
Басс Д.Ю. 62, 66
Батищев О.В. 6, 8, 9
Бауд М. 9, 21
Бахтюков А.А. 93
Бачева А.В. 6
Башарова К.С. 81
Башкиров П.В. 11, 30, 41, 123
Баюнова Л.В. 93
Баюрова Е. 57
Баюрова Е.О. 59, 61, 63
Безбородова О.А. 66
Безрукова А.И. 81
Безуглов В.В. 79
Бейлин А.К. 21
Беликова М. 57
Белова С.П. 106
Белогуров А.А. 14
Белоусов А.С. 6
Белоусов В.В. 62, 66, 72, 75, 76, 111
Беляева В.С. 69–71
Беляков С.В. 79
Бенашур А. 117
Бермудез-Маргаретто Б. 117
Бершакский Я.В. 7
Бескровная М.А. 23
Беспярых Д.А. 58
Бец В.Д. 51
Бидюк В.А. 28
Бидюк В.А. 61
Билан Д.С. 75
Бирюков М.М. 20, 64
Биченкова А.В. 25
Благовещенский Е. 117
Благовещенский Е.Д. 107, 109, 120
Блинова Е.А. 51
Блохин В.Е. 79
Бобров Н.В. 76
Бовин Н.В. 51–53
Богданов А. 74
Богданов А.А. 75
Богданов В.В. 80
Богданова Ю.А. 76
Богомазова А.Н. 38
Богомякова М.Е. 28
Богородова В.И. 118, 119
Богословская О.А. 29
Божко Я.Г. 112
Божкова С.А. 45
Божокин М.С. 45
Бойченко В.С. 32
Бокша И.С. 7
Большаков А.П. 81
Бондарева В.М. 85
Борзых А.А. 104
Борисова А.Ю. 69, 70
Борисова-Мубаракшина М.М. 46
Боровик А.С. 104, 113
Борозденко Д.А. 82, 84, 118
Борщевский В.И. 6, 12, 15
Бочаров Э.В. 7
Бочков А. 48
Браже Н.А. 121
Бредихин Д. 117
Бредихин Д.О. 107, 109
Брезгин С.А. 61, 63
Бровко Ф.А. 56
Брындина И.Г. 108
Бубис Ю.А. 27, 33
Букато О.Н. 4
Булавко Е.С. 6
Буланова О.И. 101
Булатов Э.Р. 9, 21, 42, 63, 66
Буник В.И. 10, 12
Бурбаева Г.Ш. 7
Буренина О.Ю. 10
Бурмистрова Н.Р. 10
Бурханова-Закирова Г.Ф. 83
Бутенко И.О. 4, 30, 36, 38, 39
Бутова К.А. 112
Бухман В.Л. 70
Бушуева О.Ю. 69
Быков И.М. 71
Вазетдинова А.А. 82
Валеева Г.Р. 82, 87
Валиуллина А.Х. 42, 63, 66
Валиуллина-Рахматуллина Ф.Ф. 82
Валова Я.В. 27
Валуев-Эллистон В. 57
Варакса Т.С. 12
Варижук А.М. 11
Варламов М.Е. 20, 65
Варфоломеева Е.Ю. 20
Васин А.В. 30, 59
Вахрамеев Д.Д. 15
Вепхвадзе Т.Ф. 32, 104, 105
Ветошкина Д.В. 46, 47
Виговский М.А. 32
Виноградова Д.С. 24
Виноградова О.Л. 113
Винокуров А.Ю. 70, 71
Винокурова Д.Е. 83, 84
Вириясов М.Б. 16
Владимиров А.С. 71
Владимиров Д.О. 26
Владимирова С.А. 90
Власов В.В. 25
Воеводина Е.А. 117
Воловик М.В. 8
Волокитина Е.А. 95
Вольнский П.Е. 7
Вольф Н.В. 119
Воробьев Р. 98
Воробьева Е.А. 7
Воронина А.К. 28
Воронина М.В. 5
Воронина Я.А. 114
Воронцова Т.С. 101
Воротеляк Е.А. 21

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи

3–8 октября 2022

- Воротников А.В. 105
Вострикова Л.В. 104
Вострокнутова Г.Н. 73
Высочинская В.В. 59
Вьюнова Т.В. 8
Габибов А.Г. 16, 18, 19, 35
Гаврина А.И. 76
Гавшина А.В. 74
Гази Э.Ш.М.О. 61
Гайнутдинов А.Р. 82, 87
Галагудза М.М. 112
Галева А.В. 8
Галкина К.В. 18
Галли Дж. 117
Ганеева И.А. 63
Ганеева И.И. 42
Ганчарова О.С. 80
Гапонова С.К. 25
Гарасва Л.А. 26
Гаранина И.А. 39
Гарибова Л.А. 27, 33
Гафурбаева Д.У. 67
Гвоздева А.П. 116
Генерозов Э.В. 38
Генинг С.О. 67
Герасименко Ю.П. 93
Герасимов А.С. 15
Герт Т.Н. 19
Гехт А.Б. 107
Гилеп А.А. 12
Гладких А.С. 58
Гладышев В.Н. 28
Глигонов И.А. 73
Глушканкова Л.Н. 90
Гненная Ю.А. 64
Говорун В.М. 28
Говорун В.М. 4, 30, 32–40, 57
Головкина Д.А. 42, 43
Головченко В.В. 52
Голубев Я.В. 82
Гончар Д.И. 82, 118
Гончаров Н.В. 89
Гончарова А.А. 71
Гончарук С.А. 14
Горбатенко В.О. 80
Горбачева Л.Р. 114
Горбунов К.С. 30
Гордеева В.Д. 36
Гордейчук И. 57
Гордейчук И.В. 59, 61
Городничев Р.Б. 58
Городничева Т. 57
Горшков М.В. 27, 33
Горшкова Т.А. 51, 52, 55
Горяинов С.В. 80
Готро А.М. 98
Граф А.В. 10, 12
Грачев А.А. 24
Григорьев А.А. 122
Григорьева Е.В. 81
Григорьева М.С. 122
Григорьева О.А. 32
Григорьева П.А. 83
Григорьева Т.В. 4, 39
Гросфельд Э.В. 28
Гугин П.П. 64
Гудкова А.А. 107
Гужова И.В. 90, 99
Гуляев С.А. 59
Гуляева Т.В. 59
Гулян М.В. 92
Гуртовой Д.Е. 69
Гусач А.Ю. 15
Гусев К.О. 90
Гусев С.А. 31
Гусева М.К. 31
Давлетбаева А.Р. 100
Давлетгильдеева А.Т. 23, 24
Давлетшин Д.Р. 9, 21
Дададжанова А. 121
Дашевский Д.Е. 9
Даюб Али 98
Дедков В.Г. 58
Деева В.В. 75
Дейкин А.В. 69–71
Демкин В.П. 95, 115
Демкин О.В. 121
Дениева З.Г. 6, 9
Денисенко Ю.А. 43, 44
Денисов Е.В. 98
Денисова Я.Е. 71
Дербиков Д.Д. 41
Деркач К.В. 85, 93
Дерунец А.С. 41
Джаппи Д. 76
Джеппи Д. 72
Джунусова Г.С. 100
Джэппи Д. 111
Дидыч Д.А. 66
Дмитриев С.Е. 26, 28
Долгалев Г.В. 29
Долгих А.И. 69
Долотова С.М. 58
Донцова О.А. 10, 68
Другова С.В. 37
Дружкова И.Н. 77
Дюжикова Н.А. 96
Евдокимова О.Л. 41
Евсютина Д.В. 36, 38, 39
Егоркина С.Б. 101
Егоров А.Д. 58
Егоров В.В. 45
Егорова В.С. 5
Егорова М.А. 30
Ездоглян А.А. 84
Елагин В.В. 76
Елисеева О. 57
Елпасава Е.А. 59
Емекеева Д.Д. 29
Ермак И.М. 48
Ермилов Ф.К. 43
Ермолович Е. 117
Ершова Н.М. 13, 46
Есюнина Д.М. 22, 23
Ефименко А.Ю. 32
Ефимов Б.А. 28
Ефремов Р.Г. 7
Жданова П.В. 15, 18
Жедяев Р.Ю. 104, 113
Желтиков А.М. 72, 75, 111
Жердева В.В. 74, 75
Жиснгалиева А.К. 114
Жуйкова С.Е. 101
Жунусов Н.С. 70
Жунусов Н.С. 71
Журавлева О.А. 104
Журавлева Т.В. 104
Журишкина Е.В. 42, 43, 49, 50
Заболотская И.В. 104
Забродская Ю.М. 83
Забродская Я.А. 45
Заводовский К.В. 115
Завестовская И.Н. 122
Завилейский Л.Г. 10
Загайнов В.Е. 76
Загайнова Е.В. 76, 77
Загрядская Ю.А. 7, 12
Заднепровская Е.В. 47
Закирова Н.Ф. 62
Закирова Н.Ф. 66
Закиян С.М. 81
Закревский Д.Э. 20, 64
Зальгин А.В. 121
Замятина А.В. 56
Замятнин А.А. 5
Замятнин А.А. 61, 63
Зарайский А.Г. 96
Зареченская А.С. 10
Зарипова К.А. 106
Захаров А.В. 84
Захарова Е.Ю. 81
Зеленская И.С. 103, 116
Зеленцова А.С. 69, 70
Зеленцова Е.А. 33
Зенкова М.А. 25
Зерний Е.Ю. 6, 80
Змиевская Е.А. 42, 63
Золотых М.А. 66, 67
Зоров И.Н. 43
Зубкова О.А. 38
Зуев Е.В. 41
Зуева И.В. 88
Зюзин М.В. 61, 63, 77
Ибрагимова А.Р. 73
Ибрагимова Н.Н. 55
Ибраева С.С. 114
Ибраимов С.Б. 100
Иваненко А.В. 62, 66
Иванов А. 57
Иванов А.В. 62, 66
Иванов Б.Н. 47
Иванов В.Т. 4
Иванов М.В. 27, 33
Иванова А.Д. 75
Иванова А.С. 96
Иванова К.А. 123
Иванова Л.А. 45
Иванова О.М. 4, 28, 30, 32, 34, 35, 37
Ивченков Д.В. 11
Игнатова Л.К. 47
Игнатова Н.И. 77
Иллариошкин С.Н. 34

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи

3–8 октября 2022

- Ильгисонис Е.В. 37
Ильина Е.Н. 4, 35
Ильинский Н.С. 85
Илюкина Н.А. 109
Илюкина Н.А. 109
Илюшкина А.А. 30
Иомдина Е.Н. 80
Исакова Л.С. 101
Истомина М.С. 99
Кадиева Д. 117
Кадникова Н.С. 100
Казакова А.Н. 30
Казакова Е.М. 29
Казачкина Н. 74
Казачкина Н.И. 75
Казначеева Е.В. 90
Кайшева А.Л. 33
Какоткин В.В. 98
Калабушева Е.П. 21
Калашников В.Е. 103
Калининченко А.Л. 76
Калмыкова Г.В. 51
Калуцкий М.А. 6
Камарова К.А. 13, 46
Камынина А.В. 7
Канавин А.П. 122
Канажевская Л.Ю. 11
Капелько В.И. 112
Капранов И.А. 12
Капрельянц А.С. 73
Карабут М.М. 76
Карань А.А. 81
Каратовская А.П. 56
Каргинов А.В. 77
Карлина И.С. 12
Карнаева А.Е. 62, 66
Карпинская В.Ю. 103
Карпова М.А. 12
Карыпова Б.К. 100
Касацкий П.С. 24
Касимова А.А. 49, 56
Катунцев В.П. 104, 108, 110
Кашина Ю.В. 100
Каюмова Р.М. 88
Кельмансон И.В. 72, 75, 111
Киселева Н.М. 84, 119
Кислицин В.Ю. 43
Китов В.В. 106
Кициловская Н.А. 30
Кладова О.А. 12, 23
Кладченко Е.С. 102
Клименко Д. 122
Климина К.С. 38
Климович П.С. 98
Клотченко С.А. 30, 59
Ключникова Е.О. 58
Книрель Ю.А. 49
Книрель Ю.А. 56
Кнорре Д.А. 18
Кнутова Н.С. 108
Кобзева К.А. 69
Ковалева П.А. 89
Коваль В.В. 5, 11, 15, 18
Коваль О.А. 20
Коваль О.А. 64, 65
Козлов Д.С. 76
Козлова А.С. 31, 37
Козлова Л.В. 52
Коклин И.С. 70
Кокорева Н.Е. 90
Кокоулин М.С. 50
Колачева А.А. 79
Колесников Д.О. 90
Колесников С.С. 91
Колесникова В.А. 62
Колесникова В.В. 17
Колесова Е. 122
Колесова Е.П. 5
Колодкин А.Н. 65
Комаревцев С.К. 13
Комаров С.В. 80
Комарова Т.В. 13, 46
Комиссаров А.Е. 43
Комкова О.П. 101, 102
Кондратьева С.А. 66
Кондрашова А. 57
Кондрашова А.С. 59
Коневега А.Л. 22
Коневега А.Л. 24–26
Коннова С.А. 54
Кононов Л.О. 53
Копылов А.М. 62
Копылов А.Т. 33
Копытин Г. 117
Корженевский Д.А. 62, 66
Корнеев Е.В. 58
Корниенко М.А. 58
Корнилов Ф.Д. 14
Корокин М.В. 70
Корокина Л.В. 70
Королев А.Г. 118
Короткова О.Г. 43
Корягина А.А. 81
Коряк Ю.А. 108
Корякина И.Г. 77
Корякина М. 117
Корякина М.А. 109
Корякина М.М. 107, 120
Костарева О.С. 16
Кострова И.В. 92
Костюшев Д. 57
Костюшев Д.С. 61, 63
Костюшева А. 57
Костюшева А.П. 61, 63
Косых А.В. 21
Котловская Л.Ю. 121
Котова Д.А. 75
Котова П.Д. 90
Кочергин А.Ю. 104
Кочкарова И.С. 71
Крапивина А.А. 47
Красота А.Ю. 26
Краюшкина А.М. 70, 71
Кропочева Е.В. 22
Круглов А.А. 39
Кручинин Е.Г. 19
Крылов Д.П. 76
Крылова Н.В. 48
Куджаев А.М. 4, 6
Кудряева А.А. 14
Кудряшов А.А. 13, 46
Кузичкин Д.С. 104
Кузнецов А.А. 4
Кузнецов Д.А. 6
Кузнецов Н.А. 12, 14, 23, 24, 31
Кузнецова А.А. 31
Кузнецова Д.С. 68, 76
Кузнецова Л.С. 99
Кузьмин В.С. 114
Кузьмич А.И. 66
Кузьмич А.С. 50, 55
Кузьмичев П.К. 7
Кулакова М.В. 77
Кульбачинский А.В. 22, 23
Кульминская А.А. 42, 43, 45, 49, 50
Кушцов Н.С. 58
Курганникова А.И. 95
Курилова О.В. 30
Курочкина Н.С. 32, 105
Кутепов С.М. 95
Кухарева Т.А. 102
Кухтевич И.В. 28
Кэне Т. 10
Лаврова А.В. 79
Лагарькова М.А. 28, 30, 32, 34, 35, 37, 38
Лазарев В.Н. 11, 57
Лазарев В.Ф. 99
Лазарева А.А. 36, 38
Лайков А.В. 4
Ламердонова Ф.Х. 61
Ланин А.А. 72, 111
Лапина И.М. 43, 50
Лаптинская Т.В. 53
Ларин А.К. 38
Латанова А. 57
Латышев О. 57
Лацис И.А. 11
Лебедев Д.В. 45
Лебедев И.А. 93
Лебедева М.В. 17
Левицкий Л.И. 27, 33
Левшин И.Б. 61
Леднев Е.М. 32, 104, 105
Леконцева Н. 22
Леконцева Н.В. 5, 15
Ленина О.А. 88
Линге И.А. 73
Липатников А.Д. 51
Лисица А.В. 31, 37
Литвинова Е.А. 51
Литвинова Л.С. 95
Ложков А.А. 30, 59
Ломакин Я.А. 16
Ломтатидзе О.В. 100
Лопухов Л.В. 4
Лохов П.Г. 34
Лошкарева А.С. 6
Лугинина А.П. 9, 15
Лукина М.В. 15
Лукина М.М. 27, 30, 32
Луничкин А.М. 116

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи

3–8 октября 2022

- Лучникова Т.А. 92
Лысова Н.Ю. 110
Львова И.Д. 103, 106
Любашина О.А. 86
Ляпина Е.А. 15
Ляпунов И.С. 116
Ляпунов С.И. 116
Ляхман Д.Н. 119
Мавиза Т.П. 10
Макаров В.А. 61
Макаров С.В. 61, 63
Максимов Г.В. 61, 63
Макшакова О.Н. 52
Малабуйок Д.М. 16
Малахова М.В. 28, 58
Малашенок Л. 74
Малашенко В.В. 95
Мальхина И.А. 114
Мальсанова К.А. 33
Мальцев Д.И. 76
Мальянц И.К. 34
Манувера В.А. 39, 57
Маргулис Б.А. 90, 99
Маркашева В.А. 36
Маркин А.А. 104
Марков Н.С. 112
Мартынов А.И. 4
Мартынова Н.Ю. 96
Марченко Д.М. 45
Марченков В.В. 5
Марынич Н.К. 74
Марьин Е.В. 15
Маслов В. 121, 122
Маслов Д.Л. 34
Маслов И.В. 6
Маслова М.В. 10
Массон П. 88
Масчан М.А. 35
Матюшкина А. 122
Матюшкина Д.С. 36, 38, 39, 57
Махновский П.А. 32, 104, 105
Мачулкин А.Е. 68
Медведев С.П. 81
Мельничук С.В. 115
Мизгина Т.О. 55
Микушина Е.С. 12
Микшина П.В. 51, 52, 55
Милахина Е.В. 64
Милюхина И.В. 81
Мингажева Э.Т. 27
Мингазов Б.Р. 84
Минсеев К.С. 14
Минлебаев М.Г. 87
Мирзоев Т.М. 105
Мирзоева Н.З. 18
Мирошников К.А. 13
Митин А.Н. 4
Митькевич О.В. 28
Мифтахова Р.Р. 66, 67, 73
Михайлина А. 22
Михайлина А.О. 5, 16
Михайлова А.А. 55
Михайлова Е.Р. 45
Михалкин А.А. 86
Мишин А.В. 6, 9, 15, 19
Мишин А.С. 6
Можяев А.А. 72, 111
Можеров А.М. 76, 77
Мокрушина Ю.А. 4, 6, 16, 18
Мокшина Н.Е. 51, 52
Молчанова В.И. 55
Мороз А.В. 59
Морозов Д.А. 16
Морозов К.И. 121
Морозова О.Ю. 101
Мотанова Е.С. 104
Мочалов К.Е. 121
Мошонкина Т.Р. 93
Мощенко А.А. 76
Мулюкина А.С. 38
Мунтян М.С. 16
Муслиенко П.Е. 106
Мухаметшин С.А. 42
Мухаметшина Л.Ф. 56
Мухтаров М.Р. 87
Мялик Д.С. 77
Мясников В.А. 19, 85
Мясоедов Н.Ф. 8
Мячина Т.А. 112
Надеева Е.М. 47
Назипова А.Р. 52
Найдов И.А. 46
Насретдинов А.Р. 83
Невинский Г.А. 26, 67, 72
Негребецкий В.В. 84, 119
Немировская Т.Л. 106
Нестеренко А.М. 62, 66
Нижников А.А. 46
Никифорова А.В. 52
Николаев М.А. 81
Никольская А.И. 80
Никонов О.С. 17
Никонов С.В. 17
Никонова Е.Э. 77
Никонова Е.Ю. 17
Никонова М.Ф. 4
Никотина А.Д. 90
Никулин А. 22
Никулин А.Д. 15
Новак Д.Д. 20, 65
Новиков В.Ю. 54
Новиков Н. 98
Новопашина Д.С. 12
Нокель А.Ю. 52
Норкин И.К. 95
Носкова Е.О. 18
Нургалиева А.Х. 27
Нуштаева А.А. 65
Облущинская Е.Д. 50
Овечкина В.С. 72, 111
Овчинникова Л.А. 16
Овчинникова Т.В. 22
Огородникова Е.А. 116
Одегова Е.И. 72
Одношвикина Ю.Г. 113
Олейник Г.А. 18
Олейников В.А. 121
Олейникова Н.А. 98
Орехов Ф.С. 15
Орлов О.И. 104
Орлова А. 121
Орлова А. 122
Орлова А.В. 53
Осик Н.А. 33
Осмоловский А.А. 13
Остерман И.А. 10
Охрименко И.С. 7, 12
Павленко А.В. 57
Павлов К.В. 7
Павлова Г.В. 62
Павлова Е.Н. 79, 80
Павлова С.В. 81
Панина А.Д. 51
Панова Е.А. 26
Пантелеев В.А. 22
Пантелеев П.В. 22
Парамоник А.П. 26
Парамонова Н.М. 83, 85
Пароди А. 5, 61, 63
Патова О.А. 52
Патракова Е.А. 64
Патутина О.А. 25
Перевозникова А.В. 90
Пермяков С.Е. 6, 80
Петров А.М. 113
Петров К.А. 88
Петровский Д.В. 33
Пикунов А.В. 113
Пимкина Е.В. 58
Пипия С.О. 18
Пипия С.О. 6
Пичкур Е.Б. 22, 25, 26
Плешкан В.В. 66
Плотникова М.А. 30, 59
Плужников Н.Н. 85
Поверенная Е.В. 29, 62
Подгорный О.В. 76
Покровский В.М. 71, 100
Покровский В.С. 61, 63
Покровский М.В. 70
Полесскова Е.В. 22, 24, 25
Полещук В.В. 34
Помелова Е.Д. 109
Пономарева Н.И. 61, 63
Пономаренко Е.А. 31, 62
Попов А.В. 121
Попов Д.В. 32, 104, 105
Попов К.А. 71
Попов П. 15
Попова А.В. 49, 56
Попова М.М. 6
Попыванова А.В. 109
Постоенко В.И. 27
Постоенко В.И. 33
Потехина Е.С. 62, 66
Почечуев М.С. 75
Приводнова Е.Ю. 119
Примаченко Г.К. 104
Приходько О.Б. 92
Прокофьева Д.С. 27
Простова М.А. 22
Протопопов В.А. 108

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи

3–8 октября 2022

- Прохорова Т.А. 7
Прочий Р.Р. 108
Пунина П.В. 101
Пученкова О.А. 71
Пучкова А.А. 104, 110
Пчелина С.Н. 81
Пятибратов М.Г. 8
Пятницкий М.А. 62
Ракитина О.А. 66
Рапопорт Е.М. 53
Рахимжанова Ж.А. 114
Рахматуллина А.Р. 66, 67, 73
Ревещин А.В. 62
Ризванов А.А. 66, 67, 73
Риппа А.Л. 21
Рихтер В.А. 20
Рогачевская О.А. 91
Родимова С.А. 76
Рожкова А.М. 43
Розов А.В. 72, 76, 82, 111
Романенко Л.А. 50
Романцова Е.Б. 92
Ромозанова А.М. 73
Рубина К.А. 98
Рубцов Ю.П. 35
Руденко Н.В. 56
Руденко Н.Н. 46
Руденко Н.Н. 47
Руденко Т.В. 95
Руднев В.Р. 33
Рыбакова Е.Ю. 89
Рыжов И.М. 53
Рысакова К.С. 54
Рябов Ф.Д. 61
Сабинин С.С. 72, 111
Сабит А.Е. 114
Савеко А.А. 107
Савицкая А.Г. 14
Савицкий А.П. 73, 74
Савушкина О.К. 7
Савченко М.С. 53
Сагъдеева А.Р. 67
Сальников О.П. 91
Самарин А.А. 41
Самойлов А.Е. 58
Сатаева Н.У. 100
Сауткина О.В. 51
Сафонова М.В. 58
Сафронова Н.А. 19
Сахно Д.С. 93
Сбарцалья В.А. 58
Своєглазова А.Е. 5, 16
Седых С.Е. 26, 67, 72
Секунов А.В. 108
Семашко Т.А. 38
Сембекова К.Т. 114
Семенов В.Э. 88
Семенов Д.В. 64
Семин Я.К. 39
Семина Е.В. 98
Семьянов А.В. 121
Сенаторова Н.А. 110
Сенин И.И. 80
Сенченкова С.Н. 49
Сенчунова С.И. 31
Сергеева М.Г. 80
Сергеева С.С. 85
Сергиев П.В. 10
Сибирякина Д.А. 12
Сигида Е.Н. 54
Синельников И.Г. 43, 44
Синетова М.А. 47
Синицын А.П. 43
Синицына О.А. 44
Синцов М.Ю. 82
Синягина М.Н. 39
Ситдикова В.Р. 87
Скворцов Д.А. 68
Скитева Е.Н. 83
Скляник И.А. 105
Скоркина М.Ю. 69, 70
Скулачев В.П. 16
Слатинская О.В. 61, 63
Сливка Е.В. 53
Случанко Н.Н. 14
Смирнов И.В. 4, 6, 16, 18, 19
Смирнова Е. 121
Смирнова О. 57
Смородина Е.И. 92
Соколов А.В. 20
Соколов Р.А. 76
Соколова Д.В. 61
Соколова Д.В. 63
Солдатов А.А. 102
Солдатов В.О. 69–71
Солдатов М.О. 69, 70
Соловьёва Д.О. 121
Соловьёва О.Н. 12
Соловьёва О.Э. 111, 112
Сольвьёв И.Д. 74
Солнос Г.М. 76
Сорокин Д.Ю. 16
Сорокин И.И. 26
Сорокоумов В.Н. 93
Сперанская А.С. 58
Спивак Ю.С. 81
Ставровская Д.М. 104, 110
Станишевский Я.М. 61
Стародубова Е. 57
Степанов А.А. 33
Степанов А.В. 35
Степенко Ю.В. 71
Степечкина А.М. 93
Стецкая Т.А. 69
Столярова А.Н. 71
Столярская М.Я. 15
Строилов В. 48
Струшкевич Н.В. 12
Судоплатов М.А. 75
Судейманова А.Д. 44
Судейманова Е.М. 81
Судейменова Ф.М. 114
Султанов Р.И. 38
Сумбатян Д.А. 20
Сурков С.А. 79
Суслова Ю.В. 92
Сутягина О.И. 121
Сухачёва О.А. 19
Сухов И.Б. 85
Сухоставцева Т.В. 104
Сушкевич Б.М. 86
Суюндукова А.Т. 115
Сырочева А.О. 5
Сюняев Р.А. 113
Сюткин А.С. 8
Тагунов П.А. 69
Таран А.С. 89
Таран Э.И. 70, 71
Таранов В.В. 17
Тарасова Д.М. 36
Тарасова И.А. 29
Тарасова О.С. 113
Тарбеева С.Н. 37
Терехов С.С. 4, 6, 16, 18, 19
Терёшина М.Б. 96
Терешкина Е.Б. 7
Тимофеева А.М. 72
Тимошенко В.Ю. 122
Титов А.И. 49
Тихонова П.О. 57
Тищенко С. 22
Тищенко С.В. 16
Толичева О.А. 24
Томиловская Е.С. 103, 104, 106, 107, 113, 116
Тоукач Ф. 48
Третьяк М.В. 121
Трифорова А.П. 75
Трифорова О.П. 34
Троицкая О.С. 20, 64, 65
Трофимова О.И. 55
Труфанов С.К. 89
Тузиков А.Б. 53
Тухватулин А.И. 59
Тыганов С.А. 103, 105
Тюгашев Т.Е. 12, 24, 31
Тюлина В.В. 80
Тюнин М.А. 85
Тяглик А.Б. 121
Угрюмов М.В. 79
Удут В.В. 95
Уколова П.А. 71
Украинская В.М. 35
Уланов М. 117
Урбан А.С. 4
Усачев Д.Ю. 62
Усенко Т.С. 81
Успенская А.А. 68
Ушенин К.С. 112
Фандо М. 22
Фатхутдинова Л. 61
Фатхутдинова Л. 63
Фатьянова А.В. 91
Феделе Т. 117
Федоненко Ю.П. 54
Федорова Н.Д. 20
Федорова О.С. 12, 23, 24, 31
Федосеева А.И. 38
Федотов А.Б. 75
Федотов И.В. 75
Федотова А.А. 121
Федотова Е.Ю. 34

III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ, БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ

Сочи

3–8 октября 2022

- Феофанова Н.А. 51
Фетисова Е.С. 111
Фетисова Е.С. 72
Феурра М. 117
Филаретова Л.П. 93, 101, 102
Филина Ю.В. 67
Филиппов П.П. 80
Фильштейн А.П. 55
Фисунов Г.Ю. 36, 38, 39
Фокин А.И. 98
Фомина Е.В. 110
Фролова А.С. 5, 63
Хабилова Н.Н. 73
Хадиуллина Р.Р. 9, 21, 73
Хазиахматова О.Г. 95
Хазипов Р.Н. 82–84, 86, 87
Хайдуков С.В. 51
Хайруллин Р.Ф. 73
Хамитов Р.А. 41
Хамчиев К.М. 114
Ханнанов А.А. 42
Харин А.Ю. 122
Харина М.В. 55
Харлампиева Д.Д. 57
Хасбиуллина Н.Р. 51
Хейман Т. 25
Хлусов И.А. 95
Хорн П.А. 6, 9
Хотин М.Г. 45
Хохлова А.Д. 112
Храмова Ю.В. 75
Хренова М.Г. 74
Худякова Е.П. 104
Хусаинов Г.А. 15
Хусаинова Э.М. 9, 21
Хуснутдинова Э.К. 27
Цвигун Н.В. 45
Центалович Ю.П. 33
Цибулина А.О. 121
Цой Е.А. 39
Часов В.В. 21
Челчушев Д.А. 95
Чепур С.В. 85
Черезов В.Г. 15, 19
Черенко В.А. 26, 67
Черкашин А.П. 91
Черкашина О.Л. 21
Чермных Э.С. 21
Черников О.В. 50, 55
Чернова К.А. 83
Чернова Т.Е. 55
Черноносков А.А. 5, 18
Чиглинцева Д.А. 25
Чикаловец И.В. 55
Чистяков Д.В. 80
Чистякова О.В. 85
Чуб А.С. 10
Чуланов В.П. 61, 63
Чулкин А.М. 43
Шайдуков В.А. 76
Шалагинова И.Г. 96
Шальгин А.В. 90
Шамардина Л.О. 24
Шарло К.А. 103, 106
Шарова Е.И. 38
Шарова Н.И. 4
Шаронов Г.В. 77
Шаронов Г.В. 99
Шаршов К.А. 33
Шафиков Р.Р. 68
Шахов А.С. 89
Шашков А.С. 56
Шашков И.А. 43
Швейгерт И.В. 20, 64
Швецова С.В. 49
Шевелёв Г.Ю. 38
Шевелева М.П. 80
Шевченко К.В. 8
Шеломенцева Е.М. 98
Шендер В.О. 4, 27, 28, 30, 32, 34, 35, 37
Шенкман Б.С. 103, 105
Шереметьева М.Е. 41
Шерозия М.Г. 86
Шестакова А. 117
Шестакова А.Н. 107, 109
Шестакова М.В. 105
Шестопалова М.С. 121
Шешукова Е.В. 13
Шиленок И.В. 69
Шилова Н.В. 51, 52
Шимолина Л.Е. 62, 66
Шипков Д.Д. 82, 87
Ширманова М.В. 62, 66, 77
Широков Д.А. 57
Ширшин Е.А. 77
Шитиков Е.А. 58
Шишкин Н.В. 106
Шкригунов Т.С. 31
Шлеева М.О. 73
Шмиголь Т.А. 84
Шнайдер М.М. 49
Шнайдер П.В. 28, 30, 32, 34, 35, 37
Шнейдер М.М. 56
Шокина В.А. 39, 57
Шошина И.И. 103, 116
Шпаков А.В. 104, 110
Шпаков А.О. 85, 93
Шпирт А.М. 49, 56
Штам Т.А. 26
Штыкова Е.В. 6
Штыров Ю. 117
Шульгина О.В. 22, 25
Шумкова В.В. 87
Шурганова Е.В. 77
Щербакова Л.А. 44
Щербинина С. 48
Щеславский В.И. 77
Щечкин И.Д. 68, 76
Энейская Е.В. 49
Эргашева М.М. 15
Юдина Н.С. 19
Юзикаева Э.Р. 87
Юзефович А.П. 58
Юрова К.А. 95
Якушева А.В. 25
Яненко А.С. 41
Япрынцев А.Д. 45
Яровая О.И. 91
Ярушкина Н.И. 101, 102
Яскелайнен И. 117



**III ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ ФИЗИОЛОГОВ,
БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ**
♦ VII СЪЕЗД БИОХИМИКОВ РОССИИ
♦ X РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»
♦ VII СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ
(Сочи, 3–8 октября 2022).
ТОМ 3

Издательство «Перо»
109052, Москва, Нижегородская ул., д. 29-33, стр. 15, ком. 536
Тел.: (495) 973-72-28, 665-34-36
Подписано в печать 02.12.2022. Формат 60×90/8.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 16,25. Тираж экз. Заказ 1041.