

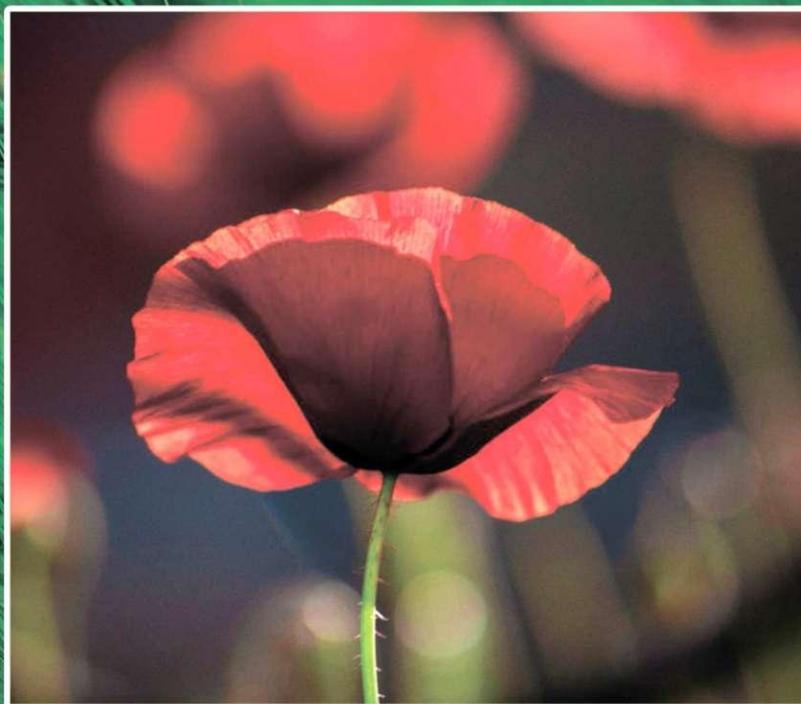
19-я Международная пушинская школа-конференция молодых ученых



# Биология

*Наука XXI века*

## Сборник тезисов



Пушино, 2015

ответ на введение белков VP6VP8 и FlіCVP6VP8, являются нейтрализующими. Планируется детально изучить механизм, посредством которого формируется иммунный ответ на вводимые белки и перспективу их использования в кандидатной вакцине от ротавируса.

## **ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСА И ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭКСПРЕССИИ КЛЕТКАМИ EGFP, НА СЕКРЕЦИЮ ЦИТОКИНОВ *IN VITRO***

**Гатина Д.З., Лайков А.В., Гаранина Е.Е., Романова Ю.Д., Салафутдинов И.И.**  
ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*sal.ilnur@gmail.com*

Аденовирусы широко представлены в человеческой популяции и насчитывают около 100 серотипов. Как правило, они вызывают легкие формы заболеваний, однако в некоторых случаях могут быть причиной серьезных осложнений. Кроме того, аденовирусы являются перспективными системами для доставки различных терапевтических генов, проведения иммунизации и т. д. С этой целью создаются и разрабатываются рекомбинантные аденовирусы.

В представленной работе нами анализировался рекомбинантный репликативно-дефектный аденовирус человека пятого серотипа экспрессирующий ген усиленного зеленого флуоресцирующего белка (Ad5-EGFP). Очищенные вирусные частицы лизировали, разделяли в полиакриламидном геле и окрашивали раствором Кумасси. Отдельные белковые полосы вырезали из геля и подвергали гидролитическому расщеплению трипсином. Пептидные экстракты разделяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием нанохроматографа UltiMate 3000 Nano LC (Thermo Scientific), получение МС-скана проводили на масс-анализаторе MaXis impact (Bruker). Анализ результатов проводили в программе Mascot (Matrix Science).

В ходе анализа был установлен протеомный профиль Ad5-EGFP, в частности были выявлены белки капсида (гексон рII, основание пентона рIII, фибер рIV), коровые белки (основной коровый белок рV, белок рVII, ДНК терминальный белок, L1 52kDa белок, протеаза) и минорные белки (капсид белок-предшественник рIIIa, капсид белок-предшественник рVI, капсид белок-предшественник рVIII, белок капсида рIX).

На втором этапе работы мы проводили оценку влияния трансдукции Ad5-EGFP на секретомный профиль стволовых клеток из жировой ткани человека (ADSC) с применением технологии xMAP (Luminex). Трансдуцированные ADSC экспрессировали EGFP, и секретировали IL-6, IL-10, TNF-alpha, IL-1-beta и IL-4, при этом, мы не обнаружили отличий в секреции исследованных цитокинов между нативными и генетически модифицированными клетками.

## **РАЗРАБОТКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИСКУССТВЕННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА**

**Гомзикова М.О., Ризванов А.А.**

ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*Albert.Rizvanov@kpfu.ru*

Многообещающим инструментом стимуляции регенерации является клеточная терапия клетками человека. Известно, что основной положительный эффект на процесс ангиогенеза связывают со способностью трансплантированных клеток к воздействию на клетки микроокружения посредством межклеточной коммуникации с образованием микровезикул. Показано, что микровезикулы содержат различные биологически активные молекулы, которые они способны доставлять в другие клетки. Таким образом, микровезикулы представляют собой естественные вектора организма.

Однако, количество естественно выделяемых клеткой микровезикул невелико, поэтому получение искусственных микровезикул клеток человека в достаточном для терапевтического применения количествах явилось целью нашей работы.

В качестве модели для разработки эффективной и биобезопасной терапевтической системы на основе искусственных микровезикул клеток человека были выбраны клетки с высоким потенциалом к стимуляции ангиогенеза, способные к неконтролируемому делению - опухолевые клетки (подобно нативным или генетически модифицированным мезенхимным стволовым клеткам, которые в результате продолжительного культивирования/генетической модификации обладают повышенным риском онкологической трансформации). С целью получения большего количества микровезикул, клетки-доноры были простимулированы - обработаны веществом, нарушающим структуру цитоскелета (цитохалазин В), что позволило далее с помощью серии центрифугирований отделить микровезикулы от целых жизнеспособных клеток.

Впервые было показано, что искусственные микровезикулы, полученные из клеток SH-SY5Y, проявляют проангиогенное действие *in vitro* (формирование капилляро-подобных структур HUVECs) и *in vivo* (подкожное введение крысам *Rattus norvegicus*). Проангиогенное действие клеток SH-SY5Y в сравнении с искусственными микровезикулами в условиях *in vivo* оказалось сильнее ( $1,5 \pm 0,23$  сосудов на единицу площади среза против  $0,83 \pm 0,02$ ). Это связано с тем, что искусственные микровезикулы не способны к делению и осуществляли только доставку, заключенных в них биомолекул. В то же время, проангиогенное действие искусственных микровезикул *in vitro* оказалось сравнимо с эффектом, индуцированным клетками SH-SY5Y ( $43,5 \pm 3,53$  разветвления капилляро-подобной сети против  $41,33 \pm 8,51$ ).

Таким образом, микровезикулы являются перспективными инструментами для доставки веществ и стимуляции ангиогенеза.

#### ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА TB10.4 *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В КЛЕТКАХ *ESHERICHIA COLI*

**Добровольская О.А., Федорова Е.А., Черняева Е.Н., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С.**

ФГУП Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

[dobrovolskay-oly@yandex.ru](mailto:dobrovolskay-oly@yandex.ru)

Основной причиной смерти от инфекционных и паразитарных заболеваний сегодня, как и в начале XX века, является туберкулез. В России ежегодно выявляется более 100 тысяч новых случаев туберкулеза, около 25 тысяч человек умирают от этого заболевания. Смертность от туберкулеза - это 70% смертей от всех инфекционных заболеваний.

Вакцина БЦЖ существует на протяжении 80 лет и является единственной профилактической вакциной против туберкулеза. Вакцина БЦЖ обладает доказанным защитным действием в отношении туберкулезного менингита и диссеминированного туберкулеза среди детей. Однако данная вакцина имеет ограниченное применение в отношении взрослой части населения, ее протективный эффект менее выражен относительно легочной формы заболевания, и ее защитная эффективность значительно ослабевает в течение 10-15 лет. Соответственно, на данный момент, разработка новых вакцин против туберкулеза с усовершенствованными свойствами является приоритетной задачей международного научно-исследовательского сообщества. Одним из направлений в разработке новых средств профилактики туберкулеза является создание субъединичных вакцин на основе рекомбинантных белков.

В последние годы активно изучался геном *Mycobacterium tuberculosis* и других микобактерий, с целью идентификации, производства и испытания новых антигенов. Наиболее изученными и перспективными для применения в качестве компонентов новых кандидатных вакцин, на данный момент, считаются белки, входящие в состав семейства ESAT-6 (Early Secret Antigen Target-6), среди которых наиболее изучен антиген CFP-7 или TB10.4. Данный белок распознается на ранней стадии туберкулезной инфекции и способствует пролиферации лимфоцитов, ответственных за продукцию интерферона у (ИФН-у).

Цель работы заключалась в получении рекомбинантного белка TB10.4 в экспрессионной системе клеток *E.coli* и последующей его очистке.