

УДК 575.11+576.3+577.1+577.2+577.3+576.5+579.22 +579.23+579.25+578.2+57.05+57.085+593.1+616.006+616.8

**МАТЕРИАЛЫ VIII МОЛОДЕЖНОЙ ШКОЛЫ-КОНФЕРЕНЦИИ
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И ГЕНЕТИЧЕСКИМ
ТЕХНОЛОГИЯМ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН
(11–14 ОКТЯБРЯ 2022 г., ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РАН,
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ)¹**

DOI: 10.31857/S004137712207001X

СЕКЦИЯ “ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ”

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЕЗОКСИГИПУЗИНСИНТАЗЫ DHS И ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО
ТРАНЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА 5A EIF5A *CANDIDA ALBICANS***

Э. Э. К. Агбоигба^{1,*}, Э. Э. Валиахметов¹, К. С. Усачев¹, Ш. З. Валидов¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: kouranelvis@gmail.com

Гипузинирование представляет собой посттрансляционную модификацию эукариотического трансляционного фактора 5a (eIF5A), в ходе которой из специфичного остатка лизина образуется гипузин. Реакция гипузинирования катализируется ферментами дезоксирибозилтрансферазой (DHS) и дезоксирибозилгидроксилазой (DOHN) в присутствии кофактора NAD⁺ и спермидина (Cwhen et al., 2020). Данная работа посвящена изучению взаимодействия между ферментом DHS и субстратом EIF5A в присутствии никотинамидадениндинуклеотида NAD⁺ и спермидина, что в дальнейшем поможет понять механизм гипузинирования у *Candida albicans*.

DHS представляет собой цитозольную трансферазу, участвующую в первой стадии гипузинирования (Wator et al., 2020). Для своей каталитической активности фермент требует NAD⁺ в качестве кофактора. DHS катализирует перенос 4-аминобутильной части спермидина на специфический лизин предшественника eIF5A, что приводит к образованию дезоксирибозилгипузина, который затем гидроксилируется с помощью DOHN до гипузина (Chen et al., 2020).

Гены *elf5a*, *dhs* и *dohh* амплифицировали из выделенной тотальной ДНК *Candida albicans* штамм SC5314. Полученные фрагменты генов клонировали в вектор pCYCduet-1 для их совместной экспрессии. Далее фрагмент с тремя генами трансформировали в вектор pETGB1a, содержащий 6xHIS Tag на N-конце DHS. Полученную конструкцию pETGB1a:DHS:DOHN:EIF5A трансформировали в компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) pLys. Трансформанты культивировали в среде LB при 37°C до оптической плотности 0.6 при 600 нм. Потом культуру делили на четыре равных части и в каждую из них добавляли соответственно 1 – NAD⁺, 2 – Спермидин, 3 – NAD⁺ + Спермидин, 4 – необработанный контроль. После добавления изопропил-d-1-тиогаляктопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 0.5 М клетки культивировали еще 6 ч при 30°C, после чего осаждали и лизировали. Лизат центрифугировали при 4500 rpm в течение 45 мин. Белки выделяли металлохелатной аффинной хроматографией на никелевой колонке (NI-NTA). Белок 6xHIS-GB1-DHS:DOHN:EIF5A элюировали с 300мМ раствором имидазола. Полученные фракции белка в каждом случае собирали и проводили электрофорез в нативных и в денатурирующих условиях.

В ходе экспериментов мы сделали вывод о том, что в условиях коэкспрессии наблюдается функциональная активность DHS, о чем свидетельствует наличие тримерной формы белка на нативном электрофорезе в ПААГ. Также мы наблюдали, что DHS и EIF5A образуют комплекс и поэтому выделяются вместе, несмотря на то, что 6xHIS присутствует только на DHS. Наконец, мы наблюдали, что добавление NAD⁺ стимулирует димеризацию и тримеризацию DHS и усиливает его связывание EIF5A.

¹ Конференция проведена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021 г.), проект “Использование генетических технологий для поиска биомаркеров, моделирования и терапии заболеваний человека”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chen M., Gai Z., Okada C., Ye Y., Yu J., Yao M. 2020. Flexible NAD⁺ binding in deoxyhypusine synthase reflects the dynamic hypusine modification of translation factor IF5A. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. E5509.
- Wqior E., Wilk P., Grudnik P. 2020. Half way to hypusine-structural basis for substrate recognition by human deoxyhypusine synthase. *Biomolecules.* V. 10. P. E522.

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ микроРНК У ПАЦИЕНТОВ С ТРАВМОЙ СПИННОГО МОЗГА

И. А. Байчурина^{1,*}, С. В. Огурцов², И. А. Шульман², М. И. Маркелова¹, Я. О. Мухамедшина¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Республиканская клиническая больница, Казань, Россия

*E-mail: baich.rina@mail.ru

При травме спинного мозга (ТСМ) могут возникать осложнения, которые приводят к частичному или полному нарушению чувствительной, двигательной или вегетативной функций. Ликвор рассматривается как источник биомаркеров, т. к. находится в прямом контакте с центральной нервной системой (ЦНС). МикроРНК могут модулировать экспрессию генов и, таким образом, играть важную роль в различных нейробиологических процессах, таких как дифференцировка клеток, рост, пролиферация и нервная активность, а также в посттравматических патологических процессах. МикроРНК являются привлекательными биомаркерами посттравматических изменений, т.к. они стабильны в биологических жидкостях и обладают тканеспецифичностью.

Целью работы было исследовать профили микроРНК в ликворе пациентов с ТСМ в острый и подострый периоды и контрольной группы условно-здоровых добровольцев. Образцы ликвора объемом 2–3 мл были взяты с помощью люмбальной пункции при поступлении пациентов в нейрохирургическое отделение № 2 Республиканской клинической больницы (Казань, Россия). Тотальную РНК выделяли из 1.5 мл ликвора методом фенол-хлороформной экстракции с помощью TRIzol LS Reagent, с модификацией протокола производителя. Содержание микроРНК в образцах с тотальной РНК определяли с помощью набора реагентов Bioanalyzer Small RNA kit. Библиотеки для секвенирования были подготовлены с применением SEQuoia Complete Stranded RNA library prep kit. Высокопроизводительное секвенирование проводили на платформе Illumina NextSeq 500. Биоинформатический анализ проводили с применением SEQuoia RNA library.

Дифференциальная экспрессия наблюдалась для 17 микроРНК при сравнении пациентов в острый период ТСМ по сравнению с контрольной группой и для 75 микроРНК при сравнении пациентов в подострый период с контрольной группой. Наибольшие изменения наблюдались для hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-145-5p и hsa-miR-130a-3p, их экспрессия снижалась у пациентов в острый период ТСМ на 3 сут в 64 раза, и наблюдалось дальнейшее снижение экспрессии на 7 сут по сравнению с контрольной группой. Для hsa-miR-130a-3p обнаружено около 900 мишеней, включая *RAP2C* – член семейства онкогенов *RAS*, который регулирует клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Помимо этого, hsa-miR-130a-3p способна нацеливаться на *ENPP5*, который может играть роль в коммуникациях между нейрональными клетками. В дальнейшем мы планируем увеличить когорту пациентов, а также валидировать полученные данные секвенирования с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (проект № 0671-2020-0058).

НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ микроРНК В СОСТАВЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ, С ПОМОЩЬЮ МОДИФИЦИРОВАННОГО МЕТОДА РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА (CRISPR/CAS9)

Н. А. Басалова^{1,*}, М. Н. Карагяур^{1,2}, М. А. Виговский^{1,2}, М. Н. Скрябина², А. Ю. Ефименко^{1,2}

¹Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

*E-mail: natalia_ba@mail.ru

Внеклеточные везикулы (ВВ) являются сложными биологическими структурами, переносящими в своем составе множество регуляторных компонентов, таких как некодирующие РНК, рецепторы, факторы роста и др. Для изучения роли отдельных молекул в биологических эффектах ВВ необходимо разрабатывать новые

методы, направленные на их подавление и/или элиминирование. Одним из наиболее интересных классов молекул, переносимых внутри ВВ, являются микроРНК. На сегодняшний день существует ряд подходов (использование пермеабилizующих агентов или аналогов липофектамина в комплексе с синтетическими нуклеотидами), которые позволяют модулировать количество микроРНК в составе ВВ. Однако применение данных методик ставит вопросы о сохранении нативной структуры ВВ и их биологической активности. Поэтому нами была поставлена задача разработки подхода к элиминации функциональных микроРНК из ВВ, основанного на технологии редактирования генома клеток-продуцентов ВВ.

Для редактирования генов микроРНК (21 и 29с) использовали модификацию технологии CRISPR/Cas9, названную SpCas9-D10A и представляющую собой лентивирусный вектор с парой векторов-мишеней. После сортировки интересующие участки ДНК клонов трансдуцированных мезенхимных стромальных клеток (МСК) жировой ткани человека анализировали с помощью секвенирования по Сэнгеру. От клонов клеток, в геноме которых произошло редактирование, получали кондиционированную среду, из которой выделяли ВВ методом ультрафильтрации. Биологические свойства ВВ анализировали по способности подавлять TGF β -индуцированную дифференцировку фибробластов в миофибробласты на модели *in vitro*.

Результаты секвенирования показали высокий уровень редактирования генов выбранных микроРНК в МСК. Однако наиболее частым результатом редактирования было не удаление, а потеря части гена. Несмотря на это, с помощью ПЦР анализа мы показали, что как трансдуцированные клетки, так и полученные от данных клеток ВВ не содержат зрелых форм выбранных микроРНК по сравнению как с нативными клетками, так и с контрольными CRISPR/Cas9-модифицированными линиями. ВВ из трансдуцированных клеток сохраняют свои характеристики – форму, размер, а также экспрессию фенотипических маркеров. Удаление микроРНК-21 и в большей степени микроРНК-29с резко снижает способность ВВ-МСК ингибировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты, что коррелирует с нашими предыдущими данными, полученными с помощью ингибирования этих микроРНК в составе ВВ при использовании коммерческого агента ExoFect и синтетических ингибиторов микроРНК (Basalova et al., 2020).

Таким образом, редактирование генома клеток-продуцентов ВВ с использованием технологии CRISPR/Cas9 может быть использовано для направленного изменения содержания микроРНК в составе ВВ, в том числе ВВ-МСК. Важно отметить, что не только полное удаление гена, но и частичное нарушение его структуры приводит к нарушению экспрессии зрелой формы микроРНК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-29-04172).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., Evtushenko E., Kulebyakin K., Grigorieva O., Akopyan Z., Kalinina N., Efimenko A. 2020. Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated microRNAs within extracellular vesicles. *Cells*. V. 9. P. 1272.

ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛИРОВАНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH МЕТОДОМ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Л. С. Басович¹*, А. Б. Малашичева²

¹Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: l.basovich@yandex.ru

РНК-интерференция представляет собой эволюционно консервативный механизм посттранскрипционного геноспецифического сайленсинга, основанный на деградации мРНК посредством ее узнавания комплементарной малой интерферирующей РНК (миРНК), находящейся в комплексе RISC с белком Argonaute, обладающим эндонуклеазной активностью. Применение метода РНК-интерференции *in vivo* до недавнего времени было затруднено неэффективными методами доставки и непродолжительным нокдауном гена. Так, например, при трансфекции миРНК увеличивается их концентрация в цитоплазме, что оказывает негативный эффект. Другим существенным недостатком является уменьшение концентрации миРНК при делении клетки.

Другая форма РНК-интерференции включает использование коротких шпилечных РНК (кшРНК), синтезируемых внутри клетки. Подобно миРНК, кшРНК могут быть трансфецированы в виде плазмидных векторов или также могут быть доставлены в клетки млекопитающих путем трансдукции с помощью вирусных векторов. В то время как миРНК доставляет дуплекс непосредственно в цитозоль, кшРНК способны к интеграции в ДНК и состоят из двух комплементарных последовательностей РНК длиной 19–25 п.н., соединенных короткой петлей длиной 4–11 нуклеотида, подобной шпильке.

Лентивирусные векторы имеют большие перспективы для применения в изучении регуляции генов, поскольку позволяют переносить генетическую информацию как в делящиеся, так и в неделящиеся клетки. К тому же переносимый полинуклеотид будет интегрирован в геном, что позволит получить стабильную клеточную линию с нокдауном гена.

Для реализации метода РНК-интерференции в качестве системы доставки генов были сконструированы лентивирусные частицы на основе вируса иммунодефицита человека I типа, кодирующие целевой ген для его активации, либо комплементарную короткую шпилечную РНК, способную ингибировать экспрессию интересующего гена в клетках человека. В качестве генов интереса выступали гены сигнального пути Notch, регулирующие развитие и дифференцировку многих типов тканей. Изучение регулирования уровня экспрессии генов осуществляли на клеточной линии HUVES. Результаты эффективности активации и применения метода РНК-интерференции были оценены методами ПЦР в реальном времени через 48 ч, проточной цитометрией через 72 ч и иммуноцитохимической окраской через 96 ч после трансдукции.

Анализ экспрессии гена *HEY1* методом количественной ПЦР указал на активацию сигнального пути Notch при трансдукции соответствующими лигандами и реализацию метода РНК-интерференции при трансдукции кшРНК. Было выявлено, что подавление экспрессии гена эффективнее при запуске РНК-интерференции за сутки до активации целевого гена. Полученный результат сопоставим с данными, полученными методом проточной цитометрии и иммуноцитохимической окраской клеток.

ПРИМЕРЫ ГЕНОВ, ТРАНСКРИБИРУЕМЫХ НА ХРОМОСОМАХ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК ДОМАШНЕЙ КУРИЦЫ: FISH-ВЕРИФИКАЦИЯ ДАННЫХ ТРАНСКРИПТОМА

В. А. Бернгардт^{1,*}, Т. В. Куликова¹, А. В. Маслова¹, А. В. Красикова¹

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

*E-mail: st079000@student.spbu.ru

Ядра растущих ооцитов птиц характеризуются высоким уровнем транскрипционной активности, при этом хромосомы преобразуются в хромосомы типа ламповых щеток. Транскрипционные единицы на латеральных петлях хромосом типа ламповых щеток формируют РНП-матрикс, доступный для анализа с помощью световой микроскопии. Однако геномные характеристики транскрибируемых последовательностей не были достаточно изучены. Ранее мы охарактеризовали транскриптом ядер ооцитов курицы *Gallus gallus domesticus* на стадии хромосом типа ламповых щеток. Анализ транскриптома выявил транскрипты более 14700 генов, при этом в ядре были выявлены как экзонные, так интронные последовательности.

В настоящей работе для верификации данных транскриптома ядер ооцитов домашней курицы мы использовали метод РНК-FISH, позволяющий выявлять вновь синтезируемые транскрипты на хромосомах типа ламповых щеток. В качестве зондов мы использовали ВАС-клоны из библиотеки CHORI-261, последовательности которых перекрывались с последовательностями 36 генов. Для генов, которые демонстрировали транскрипционную активность по данным транскриптома, мы выявили вновь синтезируемые транскрипты в РНП-матриксе латеральных петель в соответствующих локусах хромосом. РНК-FISH подтвердил транскрипцию как генов “домашнего хозяйства”, так и генов, специфичных для оогенеза и/или эмбриогенеза на хромосомах типа ламповых щеток. Кроме того, с помощью ВАС-клонов, перекрывающихся с интронами, нам удалось выявить отдельные интроны во вновь синтезируемых транскриптах. В качестве негативного контроля мы использовали зонды к участкам генома, перекрывающимся с генами, которые демонстрировали отсутствие транскрипции по данным анализа транскриптома. Такие зонды не гибридизовались с РНК на хромосомах типа ламповых щеток.

Верификация данных секвенирования РНК из ядер ооцитов с помощью РНК-FISH на хромосомах типа ламповых щеток позволяет проанализировать характер транскрипции и процессинга вновь синтезируемой РНК белок-кодирующих генов и генов некодирующей РНК в растущих ооцитах.

Исследование выполнено в рамках гранта РФФИ № 19-74-20075. Работа выполнена с использованием оборудования ресурсного центра “Развитие молекулярных и клеточных технологий” (СПбГУ).

ВЫЯВЛЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СТЕРИЛЬНОСТЬЮ, У ГИБРИДОВ ПОЛЕВОК МЕЖДУ *MICROTUS ROSSIAEMERIDIONALIS* И *MICROTUS MYSTACINUS*

Т. И. Бикчурина*

Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*E-mail: antanimka@gmail.com

На ранних стадиях видообразования увеличение генетической дивергенции может приводить к формированию репродуктивной изоляции, одним из ключевых механизмов которой у млекопитающих является

гибридная стерильность. Близкородственные виды *Microtus rossiaemeridionalis* и *M. mystacinus* (Rodentia; Arvicolinae) характеризуются малым временем дивергенции (менее 0.3 млн лет), что делает их удобной моделью для изучения начальных этапов формирования гибридной стерильности. Для выяснения генетических механизмов формирования гибридной стерильности между видами рода *Microtus* мы провели секвенирование транскриптома семенников половозрелых гибридов обоих направлений скрещивания, представители родительских видов были использованы в качестве контроля, с последующим поиском дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), ассоциированных с гибридной стерильностью. Был проведен гистологический и цитологический анализ особенностей сперматогенеза самцов межвидовых гибридов, а также родительских видов.

Сборка *de novo*, улучшение качества сборки, аннотация, квантификация, последующий анализ данных и функциональная аннотация проводились с помощью программного обеспечения Trinity, cd-hit, Transrate, Transdecoder, blast, kallisto, онлайн-ресурсов iDEP.95 и ShinyGO.

Впервые был собран *de novo* транскриптом данных видов полевков. Мы выделили ДЭГ, связанные со стерильным фенотипом, из них 6.6% представляло различия между гибридами разных направлений, что хорошо согласуется с данными гистологического анализа. После интеграции данных гистологического и цитогенетического анализов был составлен список генов, связанных с функциональными путями, относящимися к сперматогенезу, ассоциированных со стерильностью самцов *M. rossiaemeridionalis* × *M. mystacinus*. Таким образом, мы выявили гены-кандидаты, нарушение регуляции которых вносит вклад в формирование гибридной стерильности.

Данная работа была выполнена при поддержке грантов Министерства науки и высшего образования РФ; гранты № 0259-2021-0011 и № 2019-0546 (FSUS-2020-0040).

РАЗРАБОТКА ТЕСТ СИСТЕМЫ ДЛЯ АПРОБАЦИИ МЕТОДОВ ДОСТАВКИ КРУПНЫХ ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

А. Н. Бровин^{1, *}, А. В. Карабельский¹

¹АНО ВО “Университет “Сириус”, Сириус, Россия

*E-mail: browin.andrew@gmail.com

Генная терапия является перспективным и развивающимся направлением трансляционной медицины. Ежегодно иницируются десятки клинических испытаний препаратов на основе адено-ассоциированных вирусных векторов (AAV), обладающих высоким показателями терапевтической эффективности и безопасности. Существенным ограничением для терапии тяжелых синдромов Ашера, Дюшена, Драве является максимальная длина гена в экспрессионной кассете, поэтому остро стоит методическая задача по разработке стратегии эффективной доставки и экспрессии длинных фрагментов ДНК.

Существует несколько способов решения данной проблемы. Большая часть из них основана на механизмах направленного транс-сплайсинга, при которых сборка частей ДНК происходит с помощью использования в экспрессионных кассетах искусственных интронов. Однако такая сборка транскриптов оказывается недостаточной для достижения существенного терапевтического эффекта. Эффективная сборка терапевтических конструкций может осуществляться на уровне белковых прекурсоров с помощью добавления интеинов, выполняющих функцию белковых интронов в прокариотах и археях. Ранее эта технология уже применялась для получения рекомбинантных белков в прокариотах, однако создание дегронов, индуцирующих протеолиз токсичных продуктов сборки интеинов в эукариотах, позволило применить подход и в генной терапии. На данный момент известно несколько случаев применения интеинов в составе AAV-векторов в доклинических испытаниях, в которых была продемонстрирована высокая терапевтическая эффективность и безопасность подхода.

Целью работы является поиск новых технологических решений для эффективной и безопасной терапии синдрома Ашера и оценка клинической применимости и масштабируемости данной технологии. Известно, что группа генов *MYO7A*, *USH2A*, *WHRN*, *USH1G* является причиной врожденной и прогрессирующей слепоты-глухоты из-за нарушения работы белков соединительной ткани. Размер кодирующей ДНК данных генов выходит за пределы пакующей способности одного AAV, поэтому предлагается найти оптимальный вариант применения двухвекторной генетической системы, в основе которой будут использоваться синтетические интроны и интеины.

На первом этапе работы для поиска эффективных комбинаций генетических элементов была создана клеточная модель на основе клеточной линии пигментного эпителия ARPE19, позволяющая оценивать эффективность сборки по уровню флуоресценции и методу ПЦР. Был разработан дизайн и получены генетические конструкции, содержащие сплит-версии генов репортерных белков GFP и RFP, находящихся под контролем GRK и CMV промоторов. Сборка функциональных белков, индуцируемая интеинами, позволи-

ла детектировать флуоресцентный сигнал после ко-трансфекции, что говорит о пригодности метода для поиска эффективных и безопасных синтетических вариантов интеинов и интронов. Планируется повторить эксперимент со сборкой терапевтических конструкций генов *USH2A* и *USH1G* и подтвердить экспрессию целевого белка с помощью специфичных к ушерину антител методом Вестерн-блоттинга.

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН КАПСИДОВ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

А. Галиева^{1,*}, А. В. Карабельский¹, А. С. Малоголовкин¹, М. А. Гуреев^{1,2}, Ю. Б. Порозов^{1,2}

¹АНО ВО “Университет “Сириус”, Сириус, Россия

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

*E-mail: alima.galieva@gmail.com

Аденоассоциированные вирусы (AAV) – зарекомендовавшие себя векторы для доставки генотерапевтических препаратов в силу своей безопасности и эффективности. Однако одним из ограничений разработки и применения препаратов для генной терапии на основе AAV векторов является недостаточная для применения в терапии эффективность трансдукции. AAV является удобным объектом для генной инженерии в части модификации белков капсида вируса как рациональным дизайном, так и направленной эволюцией.

Данная работа нацелена на получение новых вариантов капсидов AAV векторов 2, 8 и 9 серотипов с повышенными трансдуцирующими свойствами для заместительной генной терапии офтальмологических и неврологических заболеваний.

Трехмерная структура AAV 2 серотипа взята из Protein data bank. С помощью методов компьютерного моделирования выбраны регионы на поверхности капсидных белков, которые потенциально отвечают за взаимодействие между мономерами капсида и их стабильность. Анализ интенсивности белок-белковых контактов установил наиболее значимые аминокислоты, замена которых критично повлияет на уровень энергии взаимодействия в исследуемом комплексе. Ввод точечных мутаций проводился в сегмент вирусного капсида, представленный в виде пентамера. Таким образом учитывалось взаимное влияние точечных мутаций на геометрию сегмента капсида. В структуре AAV подобрано 14 точек ввода мутаций с целью оптимизации свойств вирусного капсида: стабильности, пакующей емкости, эффективности трансдукции. Подбор комбинации оптимальных точечных мутаций реализуется путем вычисления свободной энергии (ΔG) и оценки ее изменения ($\Delta\Delta G$) относительно исходной структуры белка с учетом наличия внутренних напряжений. Сочетания мутаций, показавшие оптимальные изменения этих параметров, внесены в последовательность гена *cap* плазмиды для сборки AAV 2 серотипа с помощью сайт-направленного мутагенеза. Суспензионные клеточные линии НЕК-293 трансфицированы мутантными плазмидами с помощью тройной транзientной трансфекции, при которой в качестве модельного гена использовали плазмиды с генами, кодирующими GFP и RFP, под контролем конститутивных и тканеспецифичных промоторов. В результате работы отобраны варианты капсидов, которые демонстрировали сопоставимый уровень сборки по сравнению с капсидами дикого типа. В настоящее время ведется оценка стабильности капсидов, а также оценка влияния замен на эффективность трансдукции клеточных линий НЕК-293, ARPE-19 и др.

ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОГО БАЛАНСА В ПОЧКАХ МЫШЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Е. А. Ганцова^{1,*}, А. А. Гавриленкова^{1,2}, О. В. Серова¹, И. Е. Деев¹

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

*E-mail: gantsova@mail.ru

В организме человека строго поддерживается физиологический уровень pH, однако для различных органов и систем его уровень значительно варьируется. О существовании в организмах эндогенных pH-сенсоров – молекул, изменяющих свои свойства и активность под действием кислот/оснований – стало известно не так давно, поэтому активные исследования в этой области продолжаются в настоящее время. Одним из таких сенсоров является рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR), член минисемейства рецептора инсулина, которое также включает рецептор инсулина и рецептор инсулиноподобного фактора роста. В отличие от своих близких гомологов, рецепторов IR и IGF-IR, которые экспрессируются в широком спектре тканей и клеток, экспрессия IRR специфична, рецептор обнаруживается в некоторых органах в определен-

ных типах клеток. В почке IRR экспрессируется в β -вставочных клетках собирательных трубочек. У мышей (*Mus musculus*) с нокаутом гена *insrr*, кодирующего рецептор IRR, в условиях щелочной нагрузки наблюдается нарушение секреции бикарбоната, что свидетельствует о роли рецепторной тирозинкиназы IRR в регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме. С целью поиска белков, функционально связанных с рецепторной тирозинкиназой IRR, нами было проведено широкомасштабное секвенирование транскриптома почек дикого типа и нокаутных по гену *insrr*, которых содержали в нормальных условиях и в условиях щелочной нагрузки. После обсчета данных с помощью биоинформатических методов, были получены четыре набора генов, значительно изменяющие свою экспрессию в разных генотипах. Были выявлены гены, сопряженные с экспрессией щелочного сенсора IRR и регулируемые экспериментальным алкалозом, которые были аннотированы и объединены в кластеры. Гены были сгруппированы по уровню изменения экспрессии, были аннотированы и были выбраны гены, которые являются потенциально рН-чувствительными. Для подтверждения полученных результатов секвенирования, был выбран метод ПЦР в реальном времени. Были проверены методом ПЦР в реальном времени гены *slc51b*, *slc26a4*, *rps7*, *slc5a2*, *aqp6*, *plcd1*, *gapdh*, *rny3*, *lypd2*, *kcnk5*, *slc6a6*. Достоверное изменение экспрессии показали следующие гены – *slc26a4*, *rps7*, *slc5a2*, *aqp6*, *plcd1*, *gapdh*, *rny3*, *lypd2*, *kcnk5*, *slc6a6*. Из них в нормальных условиях увеличили свою экспрессию в нокауте – *aqp6*, *rny3*, *lypd2*, *kcnk5*, *slc6a6*; уменьшили экспрессию в нокауте – *slc26a4*, *rps7*, *slc5a2*, *plcd1*, *gapdh*. Многие из этих генов являются интересными кандидатами для описания регуляции равновесия кислот и оснований в почке. Таким образом, изменение экспрессии вышеупомянутых генов в почках мышей, нокаутных по *insrr*, может свидетельствовать о функциональной взаимосвязи генов, и об их возможной роли в ранее не описанных молекулярных механизмах регуляции кислотно-основного баланса в организме.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты №№ 19-34-90177, 20-04-00880).

БЕСКЛЕТОЧНЫЙ СИНТЕЗ БЕЛКА: РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ СКРИНИНГА АНТИБИОТИКОВ ДЛЯ *S. AUREUS*

А. А. Голубев^{1, 2, *}, Т. В. Куприянова², М. М. Юсупов³, К. С. Усачев¹

¹Лаборатория структурного анализа биомакромолекул, ФИЦ “Казанский научный центр РАН”, Казань, Россия

²ИФМИБ, Казанский федеральный университет, Казань, Россия

³Département de Biologie et de Génomique Structurales, IGBMC, Université de Strasbourg, Illkirch, France

*E-mail: golubev.biotech@gmail.com

Серьезная проблема, стоящая перед мировым здравоохранением – растущая резистентность к антибиотикам. Технически эта комплексная проблема может решаться расширением арсенала антибиотиков совместно с их грамотным менеджментом. Одна из самых эффективных стратегий поиска антибиотиков – разработка высоко пропускных поисковых платформ, которые могли бы выпускать новые молекулы поточным принципом (например, платформа Ваксмана). Платформа должна тестировать различные источники потенциальных ингибиторов с минимальными затратами ресурсов. Потенциальными резервами ингибиторов могут выступать натуральные источники, а также молекулы, активность которых была предсказана с помощью компьютерного моделирования. Большая часть антибиотиков имеют целью аппарат трансляции, поэтому система, тестирующая влияние потенциальных ингибиторов на синтез белка, может стать важной составляющей эффективной платформы поиска антибиотиков.

Мы разработали систему тестирования ингибиторов *S. aureus* на основе *in vitro* системы трансляции (бесклеточной системы транскрипции–трансляции). Разработанный нами протокол позволяет тестировать потенциальные ингибиторы *S. aureus* в 384-луночных планшетах по сигналу флуоресценции. Систему также можно использовать как основу для проведения тестов активности белков, связанных с аппаратом трансляции. Например, мы использовали систему для тестирования функциональности мутантов белка RsfS.

Бесклеточная система практически представляет собой “метаболизм в пробирке” – программируемая плазмидой реакция синтеза белка, сочетающая экстракт белков и дополнительные компоненты, например, нуклеотиды и аминокислоты, позволяющие поддерживать транскрипцию, трансляцию и ресинтез АТФ. При этом возможно провести крупномасштабную проверку и оптимизацию, легко изменяя условия – например, концентрацию добавляемых веществ в рамках одного эксперимента. В рамках нашей системы возможно разделить этапы транскрипции от трансляции и оценивать влияние на отдельные процессы.

Мы использовали теоретические наработки по бесклеточным системам, накопленные за последние десять лет и создали новый протокол для *S. aureus* с улучшенной точностью, чувствительностью и воспроизводимостью по сравнению со старыми системами. Мы также уменьшили затраты на одну реакцию путем оптимизации этапов подготовки экстракта, процессирования экстракта без ферментативного дотранслирования, снижения количеств используемых реагентов в реакции и прочих усовершенствований. Высокая стоимость ранее делала систему непривлекательной для высокопродуктивного скрининга для *S. aureus*.

Мы доказали работу системы на примере антибиотиков хлорамфеникола и тетрациклина. Мы использовали свою систему для оценки активности веществ с найденной на микробиологических тестах антистафилококковой активностью. Также мы провели тесты активности бактериальных экстрактов образцов почвенных бактерий и выявили несколько потенциальных источников ингибиторов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ “Казанский научный центр РАН”.

ХРОМОСОМНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ТРАНСКРИБИРУЕМОЙ ПРИЦЕНТРОМЕРНОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ ДНК В КЛЕТКАХ A549 И МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА: АНАЛИЗ *IN SITU* И *IN SILICO*

**Е. А. Гушча^{1,*}, М. А. Добрынин¹, Н. В. Пономарцев¹, Л. А. Белик¹, А. В. Котова^{1,2},
Т. Л. Золина², А. С. Комиссаров³, Н. И. Енукашвили¹**

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Россия

³SCAMT: Лаборатория прикладной геномики, SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

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

Транскрипция некодирующих tandemно организованных прицентромерных (ТПц) последовательностей сателлитной ДНК в настоящее время активно изучается в связи с возможной ролью в туморогенезе, ответе на клеточный стресс. Цель работы – поиск последовательностей и определение хромосомной локализации ТПц ДНК, кодирующих выявляемые в опухолях транскрипты.

Материалы и методы. Для поиска транскриптов в транскриптоме методом FISH был подобран олигонуклеотид, выявляющий ТПц ДНК сателлитов 2 и 3 на большинстве хромосом. Далее с его помощью методами биоинформатики в транскриптомах аденокарциномы легкого и ооцитов выявили несколько транскриптов и определили локализацию ТПц ДНК, их кодирующих. Результаты анализа *in silico* проверяли методом FISH на двух видах клеток: на мезенхимных стромальных клетках пупочного канатика (МСКПК) с нормальным кариотипом и на клетках аденокарциномы A549 со значительным количеством хромосомных перестроек.

Результаты. На первом этапе работы был подобран наименее хромосом-специфичный зонд DYZ1, состоящий из пентануклеотидных повторов ТПц ДНК сателлитов 2 и 3. Методами биоинформатики зонд был выявлен на 13 парах хромосом, а также на Y-хромосоме. Локализация в прицентромерных участках большинства хромосом была подтверждена методом FISH. Используя DYZ1 для поиска транскриптов ТПц ДНК в транскриптомах, было выявлено *in silico* четыре транскрипта, из которых отобрали один, наиболее представленный. К данному транскрипту была подобрана пара праймеров для синтеза методом ПЦР флуоресцентно меченого зонда, покрывающего весь транскрипт, а также подобраны олигонуклеотиды к фрагментам транскрипта. С помощью ДНК–ДНК гибридизации на метафазных пластинах обнаружили, что все зонды в проанализированных линиях, включая и зонд, покрывающий весь транскрипт, гибридизуются с более чем одной парой хромосом. С помощью праймеров также проверили присутствие транскрипта в мРНК клеток линии аденокарциномы легкого A549. В клетках A549 сигнал выявляли на большем количестве хромосом по сравнению с МСКПК, что связано с наличием хромосомных перестроек в A549. Также местоположение на хромосомах ДНК, комплементарной транскрипту, было проверено *in silico*. Показано, что он представлен в неаннотированных последовательностях, а также в сателлитных массивах 1 и 10 пар хромосом. Таким образом, данная последовательность не уникальна и присутствует на нескольких хромосомах. Однако неизвестно, активируется ли транскрипция всех этих последовательностей, или только одной, или нескольких из них. Данные, полученные в ходе исследования, подтверждают активацию транскрипции HS2 и HS3 в клетках опухолевого происхождения.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ *IN SITU* ПОЛНОГЕНОМНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА НЕК293 И NERF2 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НЕЛЕТАЛЬНЫХ ДОЗ БИСФЕНОЛА А И ХЛОРИДА КАДМИЯ

Н. И. Дергачева^{1,*}, И. О. Сучкова¹, Л. К. Сасина¹, Т. В. Баранова¹, Е. Л. Паткин¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: natalia-9999@mail.ru

Введение. Эпигеномные отклонения от нормы, вызванные поллютантами, являются возможными причинами возникновения различных заболеваний, поэтому актуальны исследования молекулярных механиз-

мов влияния факторов окружающей среды на эпигеном, что позволит разработать новые эпигенетические подходы к диагностике, профилактике и терапевтическим стратегиям лечения человека.

Цель работы. Сравнить влияние экотоксикантов бисфенола А (БФА) и хлорида кадмия на полногеномное метилирование ДНК в культурах клеток человека.

Материалы и методы. В работе исследованы клеточные линии, различающиеся по наличию рецепторов к эстрогену: ER-негативная – HEK293 и ER-позитивная – HepG2. Клетки культивировали в течение суток, затем добавляли один из токсикантов (БФА или CdCl_2) и продолжали культивирование в течение 72 ч. Конечные дозы БФА: 0.25, 0.5, 1 и 10 мкМ. Конечные дозы CdCl_2 : 0.5, 1, 2, 5 и 10 мкМ. Количественную оценку полногеномного метилирования ДНК определяли окрашиванием препаратов интерфазных ядер с помощью антител против 5^mC с иммунофлуоресцентной меткой. Для каждого исследуемого образца в *ImageJ* получали значения интенсивности флуоресценции для DAPI и антител против 5^mC, выраженные в условных единицах *ImageJ* для не менее 300 интерфазных ядер.

Результаты. В линиях HEK293 и HepG2 обнаружена нелинейная зависимость “доза–эффект” для обоих токсикантов. В HEK293 по сравнению с контролем воздействие БФА повышало метилирование CpG при дозах 0.25 и 10 мкМ, снижало его при дозе 1 мкМ ($p < 0.001$) и не влияло на метилирование при дозе 0.5 мкМ. Тогда как в HepG2 по сравнению с контролем повышение метилирования было выявлено в случае воздействия 1 мкМ, снижение – при дозе 10 мкМ ($p < 0.001$) и отсутствие статистически значимых различий при дозах 0.25 и 0.5 мкМ БФА. В тоже время воздействие CdCl_2 повышало метилирование CpG при дозах 0.5 и 5 мкМ ($p < 0.001$) и снижало при 1, 2 и 10 мкМ ($p < 0.001$) в HEK293. В линии HepG2 повышение метилирования ДНК наблюдалось только при дозе 10 мкМ, снижение – при 0.5, 1 и 2 мкМ ($p < 0.0001$) и отсутствие статистически значимых различий при 5 мкМ CdCl_2 .

Обсуждение и заключение. Степень выраженности выявленных изменений полногеномного метилирования ДНК зависела как от дозы экотоксиканта, так и типа клеток, что во многом может объясняться исходными генетическими, эпигенетическими и биохимическими особенностями этих клеток, в том числе и степенью их дифференцированности и наличием рецепторов к эстрогену. Полученные результаты могут указывать на разные молекулярные пути воздействия этих поллютантов в исследованных линиях клеток.

ИЗУЧЕНИЕ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭКДИЗОН-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ПРИ ПОМОЩИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСПОРТЕРА E23

А. А. Евдокимова^{1, *}, Н. Е. Воробьева²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: sashkaa.eevd@gmail.com

20-гидроксизон (экдизон) является единственным стероидным гормоном *Drosophila melanogaster*, который управляет многими ключевыми этапами развития организма (начиная с формирования нервной трубки и заканчивая репродукцией). Особенностью функционирования экдизонового сигналинга является способность гормона индуцировать различные пулы генов в разных тканях. К сожалению, молекулярный механизм, обеспечивающий такую пластичность ответа генома разных клеток на воздействие экдизона, в настоящее время практически не изучен.

Для изучения роли экдизона в тканеспецифической активации транскрипции генов мы используем один из природных элементов экдизонового сигналинга – транспортер E23, способный удалять экдизон из клеток. Ранее было показано, что экзогенная экспрессия этого белка приводит к нарушению экдизонового ответа и подавлению транскрипции первичных генов экдизонового каскада (Hock et al., 2000; Itoh et al., 2011). Однако в более ранних работах не было исследовано, как экспрессия данного белка влияет на транскрипцию тканеспецифических мишеней экдизона. В своей работе мы исследуем именно эту область экдизон-зависимой регуляции транскрипции.

Нами была получена трансгенная линия дрозофилы, несущая в своем геноме конструкцию для экспрессии E23, находящуюся под контролем регуляторных сайтов UAS и минимального промотора гена *hsp70*. При помощи скрещивания с драйверными линиями дрозофилы, экспрессирующими GAL4 регулятор для UAS сайтов тканеспецифическим образом, мы индуцировали экзогенную экспрессию E23 в различных тканях. При помощи вестерн-блот анализа мы проконтролировали наличие экзогенной экспрессии E23 в разных тканях потомков скрещивания трансгенной и драйверных линий. Экспрессия E23 была обнаружена во всех исследованных тканях.

С использованием полученной и охарактеризованной нами модельной системы мы исследовали вклад экдизонового сигналинга в развитие и формирование различных органов дрозофилы. Мы показали, что тка-

неспецифическая экспрессия E23 нарушает формирование ряда органов дрозофилы. В частности, экспрессия E23 при помощи драйвера *fkh* в слюнных железах привела к значительному недоразвитию данного органа. Экспрессия E23 при помощи драйвера *tj* в соматических клетках яичников привела к аресту оогенеза на 8 стадии и к стерильности самок. Мы показали, что экспрессия E23 в тканях слюнных желез и яичников приводит к нарушению транскрипции ряда генов эдизонового каскада (в частности *broad*, *E74*, *E75*, *hr3*, *hr4* и других). Тем самым мы подтвердили ранее известную информацию о функционировании E23 в качестве ингибитора эдизонового сигнала и ценного инструмента для исследований эдизонового ответа в тканях дрозофилы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Hock T., Cottrill T., Keegan J., Garza D. 2000. The E23 early gene of *Drosophila* encodes an ecdysone-inducible ATP-binding cassette transporter capable of repressing ecdysone-mediated gene activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 97. P. 9519.

Itoh T.Q., Tanimura T., Matsumoto A. 2011. Membrane-bound transporter controls the circadian transcription of clock genes in *Drosophila*. Genes Cells. V. 16. P. 1159.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ

А. С. Жук^{1,*}, А. Ю. Аксенова², И. В. Зотова⁴, Д. В. Качкин², И. И. Кострома³, А. Д. Гарифуллин³,
С. В. Грицаев³, Е. И. Степченкова^{2,4}

¹Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

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

³Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

⁴Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Санкт-Петербургский филиал, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ania.zhuk@gmail.com

Множественная миелома (ММ) — неизлечимое онкологическое заболевание, которое характеризуется гиперпролиферацией плазматических клеток, продуцирующих моноклональные иммуноглобулины. Особенностью ММ является высокая степень гетерогенности на генетическом и клиническом уровнях. Злокачественные плазматические клетки имеют сложную клональную эволюцию, поэтому на момент постановки диагноза опухоль состоит из смеси гетерогенных субклонов, что существенно осложняет лечение заболевания, а также приводит к значительным отличиям течения болезни у разных пациентов. Обычно течение ММ характеризуется повторяющимися ремиссиями и рецидивами, при этом пациенты становятся все более невосприимчивыми к лечению. Благодаря развитию технологий высокопроизводительного секвенирования были определены различные молекулярные подтипы ММ, что дает возможность для расширения критериев, применяемых при стратификации пациентов по группам риска. Несмотря на существенный прогресс в понимании генетических причин развития ММ, эти достижения недостаточно широко применяются в рутинной клинической практике и при разработке схем лечения, учитывающих индивидуальный молекулярно-генетический профиль пациентов. Одним из направлений в изучении патогенеза ММ является поиск молекулярных механизмов, посредством которых геномы клеток ММ изменяются в ходе развития болезни и в процессе лечения. Лечение, применяемое при ММ, обладает сильным генотоксическим действием и может вызывать дальнейшие геномные нарушения, которые способствуют появлению лекарственной устойчивости и рецидивам заболевания. Целью данного исследования является изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе клональной изменчивости ММ, на фоне проводимой терапии. Для изучения эволюции ММ на фоне лечения мы провели экзомное секвенирование нормальных и опухолевых клеток, полученных в дебюте заболевания и на разных стадиях терапии. У пациентов были обнаружены наследуемые варианты, которые ассоциируются с предрасположенностью к развитию ММ и чувствительностью к лекарственным препаратам, а также разнообразные нарушения в генах, обеспечивающих контроль стабильности генома. Анализ соматических нарушений позволил выявить мутации и структурные вариации в генах, которые играют важную роль в прогрессировании, ответе на лечение и исходе ММ, а также были найдены генетические изменения, которые связывают с высоким риском и неблагоприятным прогнозом течения заболевания. Таким образом, мы получили представления о динамике генетических нарушений в геноме ММ на фоне лечения, что позволяет лучше понять гетерогенность ММ и будет способствовать развитию стратегий лечения пациентов с учетом их генетических особенностей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 20-15-00081). Работа А.С. Жук выполнена при государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации в рамках программы ITMO Fellowship and Professorship Program.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ВИРУС-ОПОСРЕДОВАННОГО СМЕЩЕНИЯ УРОВНЯ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В ЦИБРИДНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Э. Г. Закирова^{1, 2, *}, В. В. Музыка^{1, 2}, И. О. Мазунин³, К. Е. Орищенко^{1, 2}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

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

Мутации в митохондриальном геноме (мтДНК) нередко являются причиной различных нейромышечных и нейродегенеративных патологий у человека. Одним из основных критериев патогенности мутации мтДНК является уровень ее гетероплазмии. Гетероплазмией принято называть состояние одновременного присутствия в органелле или клетке разных вариантов мтДНК — молекул дикого и мутантного типа. Фенотипическое проявление мутации мтДНК зачастую достигается в том случае, когда количество копий мтДНК с мутацией превышает определенный порог гетероплазмии, чаще всего в 70–90%. На сегодняшний день, среди подходов к терапии митохондриальных заболеваний особое внимание уделяют генетической инженерии митохондриального генома. Смещение уровня гетероплазмии в сторону мтДНК дикого типа возможно достичь благодаря направленной элиминации мутантных молекул с применением инструментов геномного редактирования для инициации репопуляции мтДНК дикого типа и восстановлению биоэнергетического состояния оргanelлы, клетки и всего организма.

В данной работе мы предлагаем стратегию модификации компонентов системы CRISPR/Cas9 для манипулирования уровнем гетероплазмии мтДНК в клетке. Направленный импорт нуклеазы Cas9 в митохондриях клеточных линий были достигнуты путем интеграции последовательности гена *MitoCas9*, модифицированного для экспрессии в митохондриях, в геном цибридных клеточных линий. Внутримитохондриальная локализация модифицированной нуклеазы *MitoCas9* была продемонстрирована с применением иммуноцитохимического, вестерн-блот и иммуно-электромикроскопического методов анализа. Для выявления влияния импорта модифицированной нуклеазы на морфологию митохондрий был проведен ультраструктурный и морфометрический анализ митохондрий исходных (NARP3-1 и NARP3-2) и трансгенных цибридных клеточных линий (NARP3-1–*MitoCas9* и NARP3-2–*MitoCas9*). Обнаружено изменение числа и размеров митохондрий, вероятнее всего, связанных с нарушениями в мембранном потенциале митохондрий, в результате экспрессии *MitoCas9* в трансгенных линиях.

Для эффективного импорта второго компонента системы CRISPR/Cas9 — направляющей РНК, в митохондрии клеточных линий, была разработана стратегия с применением модифицированных аденоассоциированных вирусов 2 типа (scAAV2). В первую очередь был произведен дизайн и сборка генетических конструкций, для упаковки направляющей РНК в scAAV2. С применением полученных векторов был собран ряд вирусных частиц, несущих сигнал митохондриальной локализации в капсидном белке VP2 и содержащих последовательность направляющей РНК в геноме вируса scAAV2. На сегодняшний день ведется анализ внутриклеточной локализации вирусных частиц дикого и модифицированного типа, оценка эффективности трансдукции и анализ сдвига уровня гетероплазмии в цибридных трансгенных клеточных линиях, экспрессирующих нуклеазу *MitoCas9*.

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН (FWNR-2022-0015), проекта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 2019-0546 (FSUS-2020-0040).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ ЩЕЛОЧНОГО КОМЕТНОГО АНАЛИЗА

Н. А. Змитрович^{1, *}, О. В. Шевченко¹, И. Н. Черненко¹, Н. А. Елизарьев¹, Н. Г. Плехов¹

¹ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия

*E-mail: zmitrovich199919@mail.ru

На настоящий момент разработано множество методов определения генотоксичности для скрининга новосинтезируемых веществ: флуорометрический анализ раскручивания ДНК (FADU), анализ нитей ДНК

(DNA Fiber Analysis), микроскопия прямых повреждений и ПЦР дальнего действия (Long Range PCR). Указанные методы имеют определенные недостатки, такие как невысокую пропускную способность и трудоемкий рабочий процесс, что затрудняет масштабную количественную оценку повреждений ДНК. Тогда как широко используемый метод измерения повреждения ДНК в эукариотических клетках, щелочной кометный анализ (single cell gel electrophoresis, SCGE) основан на способности отрицательно заряженных петьель/фрагментов ДНК протягиваться через агарозный гель в ответ на электрическое поле, образуя “комету”. С привлечением этого метода нами было проведено исследование генотоксического действия фотосенсибилизаторов хлорина еб и хлорофиллина на опухолевые клетки аденокарциномы Эрлиха. Внесенные в агарозу клетки для удаления мембран, цитоплазмы, нуклеоплазмы и нуклеосом обрабатывали гипертоническим лизисным раствором и неионным детергентом. Нуклеоиды помещались в щелочной раствор (pH = 12.0) для раскручивания суперспиралей ДНК и освобождения щелочно-лабильных сайтов (апуриновые/апирииминовые). В зависимости от количества таких сайтов молекулы ДНК мигрировали к аноду при электрофорезе, создавая “кометоподобный” вид в агарозе. Затем нуклеиды окрашивались SYBR Green и просматривались под флуоресцентным микроскопом при длине волны возбуждения 488 нм, полученные изображения обрабатывались с помощью программы CaspLab (Польша). Для отражения степени повреждения ДНК использовались показатели процентного содержания ДНК в “голове” кометы (HeadDNA, %), “хвосте” кометы (TailDNA, %), длина хвоста кометы (TailLength, пиксель), произведение длины хвоста и доли общей ДНК в хвосте (TailMoment). Установлено, что на 1 сут после воздействия хлорина еб и хлорофиллина (1.5 мкг/мл) с последующим облучением красным светом HeadDNA составил 39 и 59%, TailDNA для 61 и 41%, TailLength 172 и 94 ед., TailMoment 104 и 38 усл. ед. соответственно. При повышении дозы веществ до 12.5 мкг/мл, показатель HeadDNA снижался для хлорина еб до 15% и хлорофиллина до 10%, тогда как TailDNA и TailLength, TailMoment увеличивались до 85 и 90%, до 216 и 464 ед., до 183 и 420 усл. ед. соответственно. После инкубации клеток с веществами в тех же дозах в течение 3 сут отмечалась подобная закономерность по изменению параметров комет. Таким образом, метод щелочного кометного анализа прост в выполнении, позволяет получить широкое количество параметров для статистической обработки результатов, что указывает на его возможность применения для скрининга генотоксичности веществ и различных факторов.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО БЕЛКА С АНТИМИКРОБНЫМИ СВОЙСТВАМИ В ПРОТЕОМЕ ГЕМОЦИТОВ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД *EULIMNOGAMMARUS VERRUCOSUS*

Е. Д. Золотовская^{1, *}, П. Б. Дроздова¹, М. А. Тимофеев¹

¹Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

*E-mail: Zolotovskayaelenad@gmail.com

Гемоциты, клетки, циркулирующие в гемолимфе ракообразных, играют важную роль в иммунных реакциях, таких как фагоцитоз и синтез эффекторных молекул при активации иммунного ответа. Антимикробные пептиды представляют катионные полипептиды, которые экспрессируются гемоцитами после распознавания патогенов. Несмотря на большой интерес в области изучения ракообразных, состав иммунной системы и функциональное разнообразие иммунной системы ракообразных озера Байкал остаются недостаточно изученными. Работа направлена на получение данных о белковом составе гемоцитов байкальских амфипод вида *Eulimnogammarus verrucosus* с целью обнаружения антимикробных пептидов.

Амфипод отлавливали в прибрежной зоне озера Байкал в районе поселка Листвянка и акклимировали в аэрируемых аквариумах при температуре 6°C в течение 4 сут. Гемолимфу отбирали с последующей очисткой гемоцитов. Белок гемоцитов выделяли с добавлением додецилсульфата натрия (SDS), который способствует эффективному выделению мембранных белков, и без добавления SDS. Протеом гемоцитов оценивали с применением жидкостной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Образцы (с SDS и без него) были проанализированы в трех технических повторах. Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения SearchGUI v3.3.17 и Peptide Shaker v1.16.44. Белки идентифицировали на основе сборки транскриптома *E. verrucosus* GHHK01. Всего было обнаружено 1152 белка. Общее количество белков варьировалось от 697 до 878 на один повтор. Было обнаружено, что количество трансмембранных белков в образце с СДС было в два раза выше, чем в образце без него. Общее количество белков было также выше в образце с СДС. Разнообразие белков гемоцитов оценивали с использованием базы данных Panther, а для функциональной аннотации последовательностей использовали базу данных EggNOG. При этом были обнаружены разнообразные иммунные белки, в том числе лектины, супероксиддисмутаза, скавенджер-рецепторы, α -2-макроглобулины, ингибиторы сериновых протеаз.

Мы также обнаружили белок, который был назван AMP1. Данный белок содержит домен DUF3254, обладающий сходством с доменом антимикробных пептидов семейства анти-липополисахаридных факторов. Ген *AMP1* экспрессировали в клетках *Escherichia coli* штамма BL21pLysS. Для блокировки фоновой экспрессии белка клетки выращивали на среде с добавлением глюкозы и без нее. На среде с глюкозой размер и ко-

личество бактериальных колоний было заметно меньше по сравнению со средой без глюкозы. Экспрессия АМР1 была показана в культуре без добавления глюкозы, при этом был отмечен медленный рост бактерий. Эти свойства указывают на токсичность векторной конструкции с геном АМР1 и проявление антибактериальных свойств этого белка.

В данной работе был впервые получен и проанализирован протеом гемоцитов амфипод на примере байкальских амфипод *Eulimnogammarus verrucosus*. В результате анализа протеома были идентифицированы белки, которые участвуют в иммунном ответе и в частности потенциальный антимикробный пептид АМР1.

ПОЛУЧЕНИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ МУТАНТОВ ЛЮЦЕРНЫ ХМЕЛЕВИДНОЙ С ОТКЛОНЕНИЯМИ В РАЗВИТИИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ

Т. В. Калинина^{1,2,*}, С. В. Железняков¹, О. В. Пронина², И. А. Шубина², Л. М. Якоби¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: sotvk@yandex.ru

Около 80% видов травянистых и кустарниковых растений в дикой природе образуют арбускулярную микоризу (АМ) в ассоциации с грибами отдела *Glomeromycota*. Микориза улучшает снабжение растений питательными минеральными элементами (особенно фосфором) и водой, стимулирует их физиологическую и биохимическую активность; это способствует увеличению продуктивности растений и повышает их устойчивость к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. Фосфор — один из ключевых элементов минерального питания растений. Однако в результате ретроградации уменьшается доступность фосфорных соединения почвы и удобрений для питания растений. Недостаток фосфора задерживает развитие и рост растений, приводит к снижению иммунитета. В условиях дефицита доступных источников фосфорного питания в почве образование эффективного микоризного симбиоза может играть положительную роль для многих видов сельскохозяйственных растений. В связи с чем, исследования механизмов, задействованных в становлении и регуляции “эффективной работы” АМ являются актуальными. Для проведения исследований в данном направлении была поставлена задача получить с помощью химического (этилметансульфонатом) мутагенеза мутанты с отклонениями в развитии АМ на сильномикотрофной линии однолетней люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L. subsp. *vulgaris* Koch). В ассоциации с грибом *Rhizophagus irregularis* шт. 8 исходная линия люцерны образует микоризу арум типа, для которой характерен рост межклеточных гиф и образование внутриклеточных арбускул (врастающие в клетку корня и дихотомически ветвящиеся гифы) в коре корня. На почве с низким и средним уровнем доступного для питания растений фосфора образование АМ у исходной линии люцерны способствует значительному приросту урожая массы корней и надземных частей, что сравнимо с действием полдозы (по Прянишникову) минерального фосфорного удобрения, а также приводит к существенному увеличению содержания общего фосфора в растении. В отличие от исходной линии, полученные мутанты при выращивании в тех же условиях имеют слабopоложительную, нулевую или слабоотрицательную отзывчивость на инокуляцию *R. irregularis* шт. 8. Кроме того, мутанты различаются по продуктивности надземной массы и корней; среди них имеются формы с признаками карликовости, а также близкие к норме (исходной линии). В настоящее время исследование направлено на выявление фенотипических особенностей микоризы мутантов, оценку эффективности микоризы по биохимическим показателям и показателям продуктивности растений, а также на выявление способности их к образованию ризобиального симбиоза; ведутся наблюдения за стабильностью наследования приобретенных признаков у мутантов в ряду поколений.

КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ В МЕДИЦИНЕ: ОПЫТ СОЗДАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

М. Н. Карагяур^{1,2,*}, М. Н. Скрябина¹, А. А. Басалова², А. Л. Примак¹, А. Е. Толстолужинская^{1,2},
М. Е. Илларионова¹, П. А. Тюрин-Кузьмин¹, А. Ю. Ефименко^{1,2}

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

²Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: m.karagyaur@mail.ru

Экспериментальные клеточные модели являются удобным инструментом для установления функции отдельных молекул, механизмов работы сигнальных и метаболических каскадов, а также для выяснения патогенеза широкого спектра заболеваний и идентификации новых терапевтических мишеней. Новые техноло-

гии позволяют моделировать все более тонкие изменения в структуре генома и белков, и создавать все более похожие на природные модельные объекты. Перечень и возможности появившихся в последнее время технологий поистине колоссальны, в то же время, для каждой из них характерны свои технические или этические ограничения, что требует переосмысления ряда подходов к получению экспериментальных клеточных моделей. В нашей лаборатории был получен целый ряд клеточных моделей, позволяющих изучать функции отдельных белков и некодирующих РНК, визуализировать сигнальные каскады и изменение транскрипционной активности клеток.

Одной из наиболее перспективных и удобных технологий для создания клеточных моделей (в особенности с применением первичных клеток), с нашей точки зрения, является технология транс-сплайсинга: она объединяет в себе сильные стороны генной терапии (малые размеры, простота доставки) и редактирования генома (редактирование гена в его природном контексте). Ее основными ограничениями являются недостаточная эффективность (преобладание мРНК дикого типа над искомыми транс-мРНК) и образование неспецифических транс-РНК. Однако результаты литературы и наши собственные данные (на примере генов человека и мыши: *ACTA2* и *Plaur*) демонстрируют, что эффективность данного процесса во многом зависит от длины и последовательности транс-РНК, а также типа модифицируемых клеток, и, после определенной оптимизации, может быть увеличена до 30 и более процентов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00125). Исследования выполнены в соответствии с Программой развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова “Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология”. Эксперименты проводились на оборудовании, закупленном в рамках Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА ПОЛИМОРФИЗМОВ В ОБЛАСТИ OREG1191996 ГЕНА *FLT1*

Н. С. Карпова*

ФГБНУ “НИИОПП”, Москва, Россия

*E-mail: nataliakarpova.sp@gmail.com

Преэклампсия (ПЭ) относится к гипертоническим расстройствам, осложняющим около 3–5% беременностей. Традиционно ее диагностируют по сочетанию высокого артериального давления и протеинурии (Ananth et al., 2013). Несмотря на многочисленные исследования, причина развития патологии остается до конца неясной (Paiva et al., 2011).

Существует множество данных, подтверждающих, что антагонизм sFlt1 к VEGF и PlGF может вызывать эндотелиальную дисфункцию при ПЭ. Трисомия 13 (где располагается ген *FLT1*) долгое время ассоциировалась с ПЭ, что позволяет предположить, что генетическая информация на этой хромосоме может влиять на развитие патологии (Maynard et al., 2005).

В ходе GWAS и когортных case-control исследований в регуляторной области гена *FLT1* были обнаружены полиморфизмы, ассоциированные с ПЭ (Kikas et al., 2020; McGinnis et al., 2017). Причем все полиморфизмы располагаются в нескольких регуляторных областях: OREG1191996, OREG1658246, OREG1688336, OREG1537828, EN38E1663332, а также L3 LINE. Помимо rs4769612 и rs7318880, для которых доказана взаимосвязь с ПЭ, в области OREG1191996 расположены еще 7 полиморфизмов с MAF > 1%: rs7320190, rs12867370, rs4769613, rs74623647, rs7321138, rs76592233, rs9579193.

Поскольку данные полиморфизмы слабо изучены, мы использовали RegulomeDB для определения их регуляторного потенциала. В результате наибольшим регуляторным потенциалом 0.73843 обладает rs7320190 (связывание транскрипционных факторов, любой мотив, ДНКза-футпринтинг и пик ДНКазы) и, вероятно, влияет на связывание транскрипционных факторов, в частности ESRRA (ER-alpha), NR5A2, SF1. Второй полиморфизм с регуляторным потенциалом 0.67022 – rs4769613, который перекрывается с областью связывания транскрипционных факторов, любым мотивом (GCM1, GCM2) и пиком ДНКазы.

Таким образом, дальнейшее изучение функциональной роли полиморфизмов rs7320190 и rs4769613 в контексте ПЭ является актуальным, поскольку они могут стать ранними маркерами развития патологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ananth C.V., Keyes K.M., Wapner R.J. 2013. Pre-eclampsia rates in the United States, 1980–2010: age-period-cohort analysis. *BMJ*. V. 347. f6564.

Paiva P., Whitehead C., Saglam B., Palmer K., Tong S. 2011. Measurement of mRNA transcripts of very high placental expression in maternal blood as biomarkers of preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. V. 96. P. E1807.

Maynard S.E., Venkatesha S., Thadhani R., Karumanchi S.A. 2005. Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. *Pediatr. Res.* V. 57. P. 1R.

Kikas T., Inno R., Ratnik K., Rull K., Laan M. 2020. C-allele of rs4769613 near FLT1 represents a High-Confidence placental risk factor for preeclampsia. *Hypertension.* V. 76. P. 884.

McGinnis R., Steinthorsdottir V., Williams N.O., Thorleifsson G., Shooter S., Hjartardottir S. et al. 2017. Variants in the fetal genome near flt1 are associated with risk of preeclampsia. *Nat. Genet.* V. 49. P. 1255.

НОВЫЙ АМИЛОИД ЧЕЛОВЕКА PHS3 – ВОЗМОЖНЫЙ РЕГУЛЯТОР ТРАНСКРИПЦИИ

Д. В. Качкин^{1,*}, А. А. Зелинский¹, К. Ю. Куличихин¹, Ю. И. Хорольская², А. А. Рубель¹, Ю. О. Чернов³

¹Научная лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Центр клеточных технологий, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³School of Biological Sciences, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA 30332 USA

*E-mail: daniel.kachkin@icloud.com

Амилоидами называют особые фибриллярные агрегаты, формирующиеся за счет образования упорядоченных межмолекулярных кросс-бета структур. На сегодняшний день известно более 70 заболеваний млекопитающих, ассоциированных с накоплением амилоидных белков в тканях. К таким патологиям относятся болезни Альцгеймера, Паркинсона, диабет второго типа, прионные заболевания и многие другие неизлечимые заболевания. Наряду с патогенными амилоидными белками, в природе выявлены функциональные амилоиды, выполняющие важные биологические функции, такие как регуляция долговременной памяти у животных, катализ полимеризации меланина у млекопитающих, хранение пептидных гормонов, формирование биопленок у бактерий и прочие полезные функции.

Благодаря биоинформатическому алгоритму ArchCandy, разработанному в лаборатории А.В. Каявы, был произведен масштабный поиск белков, обладающих потенциалом к образованию амилоидных структур. На основании полученных данных было предсказано существование ряда новых амилоидогенных белков человека. Одним из белков-кандидатов стала изоформа 5 белка PHS3 человека, полноразмерная изоформа которого входит в состав поликомб репрессивного комплекса 1 (PRC1).

Интерес к белку PHS3 вызван не только его высоким потенциалом к образованию β -арок (структура, характерная для амилоидных белков), но и его функциональной значимостью в регуляции транскрипции. При переходе мономерного белка в амилоидную конформацию он, как правило, теряет свою функцию. В связи с этим особенно актуальным представляется изучение и определение функциональной значимости амилоидной конверсии белка PHS3.

В данной работе мы использовали различные методы проверки амилоидных свойств белка PHS3 человека в условиях *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*. В результате была подтверждена способность укороченных изоформ белка человека PHS3 формировать амилоидоподобные агрегаты при сверхпродукции в клетках дрожжей и человека. Амилоидные свойства белка PHS3 подтверждены *in vitro*. Основываясь на полученных данных, сформулирована гипотеза регуляции экспрессии генов укороченными изоформами PHS3 (5 и 6) по механизму амилоидной агрегации.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта СПбГУ № 15.61.2218.2013 и РФФ (проект № 20-14-00148). Для выполнения исследований использовалась приборная база РЦ “Хромас” и РЦ “РМиКТ” научного парка СПбГУ.

ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ И ДОРСАЛЬНЫХ ЯДЕР ШВА У МЫШЕЙ С ОПЫТОМ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА СОЦИАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ: ЭФФЕКТ ДЕКСАМЕТАЗОНА

П. Э. Кисаретова^{1,2,*}, А. С. Шулюпова¹, А. А. Сапронова¹, Н. П. Бондарь^{1,2}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

Одной из важнейших функций глюкокортикоидных (ГК) гормонов является участие в адаптации организма к различным видам физического и психоэмоционального стресса. Показано, что хронический стресс приводит к развитию резистентности иммунной системы к действию ГК. Однако на данный момент непо-

нятно, насколько такая резистентность затрагивает различные отделы головного мозга и изменяет регуляцию уровня экспрессии генов в ответ на повышение уровня ГК.

В данной работе исследованы различия в транскриптомном ответе префронтальной коры (ПФК) и дорсальных ядер шва (ДЯШ) на введение синтетического глюкокортикоида дексаметазона у контрольных животных и животных с опытом хронического стресса социальных поражений (ХССП), приводящего к развитию депрессивно-подобного состояния.

Взрослые самцы мышей линии C57BL/6 были подвергнуты ХССП в течение 30 дней. На следующий день после последнего стрессирования вводили дексаметазон в высокой дозе (2 мкг/г) или физиологический раствор. Через 6 ч производили забор ПФК и ДЯШ. Для анализа уровня экспрессии генов были приготовлены mRNA-seq библиотеки и секвенированы на платформе Illumina. Анализ дифференциальной экспрессии проводили с помощью программы DESeq2, гены с $\text{padj} < 0.05$ считались дифференциально экспрессирующимися.

Анализ транскриптомных данных показал, что введение дексаметазона вызвало изменение экспрессии большого числа генов как у контроля (ПФК – 728, ДЯШ – 301), так и у животных с опытом ХССП (ПФК – 2006, ДЯШ – 442), при этом общих генов для обеих групп было лишь 16% для ПФК и 19% для ДЯШ. Среди генов ДЯШ, экспрессия которых при введении дексаметазона изменилась только у стрессированных животных (109 генов), можно отметить гены глутаматной системы (*Grin2c*, *Ptk2b*), инсулинового сигнального пути (*Pdk4*, *Slc39a14*, *Kank1*, *Ptprf*, *Prkca*, *Carmil1*, *Svil*), и группу генов, связанных с миелинизацией (*Cnp*, *Mog*, *Ugt8a*). В ПФК уникально изменившихся генов в группе с ХССП было 1471. Они связаны с клеточной адгезией (*Cdh1*, *Rras*), экстраклеточным матриксом (*Vwf*, *Col8a2*, *Col9a3*, *Mgp*), воспалительными процессами (*Serpinf1*, *Serpinc1a*, *Rps6ka4*) и MAPK путем (*Mapk7*, *Bmp7*, *Bmp2*, *Map4k4*, *Map2k4*, *Map3k13*). Наблюдалось снижение экспрессии субъединиц рецепторов ГАМК (*Gabra2*, *Gabrd*, *Gabrg1*). Несмотря на разную интенсивность ответа на дексаметазон в ПФК и ДЯШ, можно выделить группу генов, экспрессия которых изменилась только в группе ХССП, но сразу в двух структурах. Эти гены связаны с проекциями астроцитов (*Grm3*, *Kcnk2*, *Gjb2*) и с эндоцитозом (*Unc93b1*, *Lpar1*, *Mpeg1*, *Pld4*). Интересно, что среди них есть *Htr1a*, ген ауторецептора, известного своей ролью в развитии депрессии, экспрессия которого была снижена в ДЯШ и повышена в ПФК.

Таким образом, опыт хронического социального стресса сильно изменяет ответ генов на активацию глюкокортикоидной системы как в ПФК, так и в ДЯШ. Изменение ГК регуляции уровня экспрессии может вносить существенный вклад в формирование и поддержание депрессивного состояния.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-15-00142).

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МЕХАНИЗМОВ РАЗДЕЛЕНИЯ ФАЗ В ЯДРЕ В КОНТАКТАХ ЯДРЫШЕК С ГЕНАМИ *DUX4*

Е. С. Клушевская^{1,*}, А. М. Керемет²

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: giedre@inbox.ru

Трехмерные структуры хроматина компактизируют ДНК и обеспечивают регуляцию экспрессии генов. Одним из возможных механизмов регуляции является образование биомолекулярных конденсатов в результате разделения фаз в ядре. Обнаружено, что ядрышки, благодаря своеобразному строению, могут участвовать в разделении фаз, что способствует целенаправленной регуляции активности отдельных участков генома. С помощью метода 4C (circular chromosome conformation capture, 4C) мы определили, что гены *pPHK* человека образуют контакты со многими хромосомами, наиболее часто в областях, где обнаружены протяженные метки H3K27ac, соответствующие супер-энхансерам. Изменение состояния кластеров рДНК способно оказывать влияние на активность генов, расположенных в местах контактов, что позволяет предполагать значимость физических взаимодействий в регуляции их активности. Нами были достаточно подробно изучены контакты генов *pPHK* с субтеломерной областью 4 хромосомы человека, расположенные вокруг генов *DUX4*, которые кодируют транскрипционный фактор, необходимый только в период раннего развития. Области контактов генов *pPHK* и *DUX4* тестировали с помощью гибридизации флуоресцентно меченных проб рДНК и *DUX4*. Активность транскрипции в ядрышках определяли с помощью иммуноокрашивания антителами к нуклеолину. Возможное влияние механизмов разделения фаз в ядре на контакты ядрышек с генами *DUX4* и на активность экспрессии генов *pPHK* исследовали с помощью 1,6-гександиола (1,6-HD) (алифатический спирт). Он разрушает биомолекулярные конденсаты, ингибируя слабые гидрофобные взаимодействия, необходимые для образования микрокапель. Несмотря на достаточно большое количество подобного рода исследований, влияние 1,6-HD на хроматин в живых клетках остается не до конца определенным, а из-

за различия условий экспериментов данные сильно разнятся. В работе мы нашли параметры времени и концентрации воздействия 1,6-ND, при которых как минимум 70% клеток остаются живыми. Анализ данных конфокальной микроскопии был проведен с помощью программ ImageJ и Statistica 10. В результате мы обнаружили, что 1,6-ND, несомненно, влияет на морфологию клетки. При его воздействии наблюдалось увеличение средней площади ядер от 139.25 до 179.70 μm^2 ($p = 3 \times 10^{-6}$). Кроме того, изменялось расположение фокусов гибридизации и иммуноокрашивания относительно центра ядра и друг друга (коэффициент корреляции Пирсона снижался с 0.81 до 0.69). Но при этом относительные величины расстояния между фокусами гибридизации зондов рДНК и *DUX4* не изменялись. Таким образом, полученные результаты не позволяют однозначно судить о роли механизмов разделения фаз в ядре в межхромосомных контактах ядрышек. Тем не менее, мы обнаружили, что нарушение механизмов разделения фаз приводит к изменению морфологии и структуры хроматина, что может быть важно для регуляции активности генов.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ С ТЯЖЕЛЫМ, УМЕРЕННЫМ И БЕССИМПТОМНЫМ ТЕЧЕНИЕМ ИНФЕКЦИИ *VIBRIO ANGUILLARUM*

С. Р. Курпе^{1, 2, *}, И. В. Суховская^{1, 3}, Е. В. Борвинская⁴, А. А. Морозов⁵, А. Н. Паршуков³,
И. Е. Малышева^{1, 3}, А. В. Васильева¹, Н. А. Чечкова¹, Т. Ю. Кучко¹

¹Институт биологии, экологии и агротехнологий ПетрГУ, Петрозаводск, Россия

²Институт белка РАН, Пущино, Россия

³Институт биологии КарНЦ РАН, Петрозаводск, Россия

⁴Институт биологии ИГУ, Иркутск, Россия

⁵Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

*E-mail: st.kurpe@gmail.com

В течение последних десятилетий инфекции, вызванные *Vibrio sp.*, становятся все более серьезной проблемой, которая приводит к очень большим экономическим потерям рыбоводных хозяйств. Антибиотики в настоящее время являются наиболее распространенными методами профилактики и борьбы с заболеваниями. Исследования показывают рост в окружающей среде антибиотико-резистентных *Vibrio sp.* Это ставит под угрозу продовольственную безопасность и угрожает общественному здравоохранению. Меры санитарно-эпидемиологического контроля требуют использования современных молекулярных методов диагностики здоровья и иммунного статуса выращиваемой рыбы. Мы обнаружили естественный очаг инфекции *Vibrio anguillarum* на рыбоводной ферме и охарактеризовали морфологические, гематологические и биохимические данные о патогенезе вибриоза у радужной форели.

Молекулярные механизмы, связанные с иммунным ответом хозяина, были исследованы с помощью масс-спектрометрического анализа белков плазмы форели. Среди зараженной форели были выявлены три популяции рыб в зависимости от тяжести инфекции: рыбы с тяжелыми поражениями, рыбы с умеренным инфекционным процессом и бессимптомные рыбы. Лимфопения, гранулоцитоз и спленомегалия были выражены во время течения инфекции и являлись информативными показателями тяжелого проявления заболевания, связанного с геморрагическим шоком, метаболическим ацидозом и массивным повреждением тканей. Как и ожидалось, провоспалительные интерлейкины, компоненты комплемента, белки острой фазы и антимикробные пептиды были вовлечены в острый патогенез. Системная коагулопатия сопровождалась усилением антитромботических реакций. Реконструкция метаболических путей также выявила высокую потребность в энергии для иммунного ответа у сильно пораженных рыб. Неожиданным результатом стало небольшое различие между рыбами с умеренными симптомами и рыбами без или с незначительными внешними признаками патологии (предположительно устойчивыми к инфекции). Повышенная выработка антипротеаз и усиленный каскад свертывания крови наблюдались у более здоровой рыбы, что может лежать в основе механизмов контролируемого, не вызывающего саморазрушения, иммунного ответа на инфекцию.

Согласно полученным результатам, мы предполагаем, что провоцирование тяжелого воспалительного заболевания может быть одним из факторов вирулентности *V. anguillarum*. Восприимчивость к стрессу и усиленная воспалительная реакция усугубляют течение вибриоза, что следует учитывать при выведении пород радужной форели, устойчивой к болезням. Рыба, предположительно устойчивая к вибриозу, продемонстрировала способность к ранней активации каскада свертывания, повышенной проницаемости эндотелия и усиленной выработке альфа-2-макроглобулиновой антипротеазы, которая предотвращает распространение бактерий в кровь. Эти процессы могут быть предложены для дальнейших молекулярных исследований механизмов защиты от инфекции *V. anguillarum* у рыб.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ХРОМАТИН-РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА CHD1 НА ПРОЦЕСС ДОЗОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ У САМЦОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Я. А. Кучинская^{1,*}, Ж. А. Репинская², А. Ю. Конев¹

¹НИИЦ “Курчатовский Институт” – ПИЯФ, Гатчина, Россия

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

*E-mail: kuchinskaya_yaa@pnpi.nrcki.ru

Для исследования функций консервативного хроматин-ремоделирующего фактора CHD1 (chromo-domain-helicase-DNA-binding protein 1) нами использован процесс дозовой компенсации (ДК) у *Drosophila melanogaster*, являющийся модельным для изучения факторов, вовлеченных в изменения уровня транскрипции. В рамках этого процесса у самцов дрозофилы двукратно увеличивается экспрессия практически всех X-сцепленных генов (достигается работой комплекса ДК или MSL комплекса (male-specific lethal)).

Ранее нами были получены данные о специфическом распределении белка CHD1 на политенных хромосомах у самцов дикого типа, нуль-мутантов по гену *Chd1*, при нарушениях в работе КДК, при сверхэкспрессии белка CHD1, а также об отсутствии такой специфики у других ремоделирующих факторов. Нами показано специфическое вовлечение *Chd1* в регуляцию входящих в КДК длинных некодирующих РНК гоХ1 и гоХ2. Влияние соответствующей мутации на ткане- и стадии-специфическую экспрессию днРНК анализировали методом ПЦР РВ у самцов дикого типа и нуль-мутантов по гену *Chd1* в слюнных железах, у личинок третьего возраста, в головах 4-х и 10-дневных имаго. Относительное изменение экспрессии у мутанта определяли с использованием нормализации по референсному гену *RpL32* и по соответствующим значениям у дикого типа. Уровень экспрессии гоХ1 не отличается от дикого типа в слюнных железах у мутантов, но для гоХ2 статистически достоверно показано увеличение в среднем в 1.5 раза. Тогда как для целых личинок 3-го возраста показано увеличение уровня экспрессии гоХ1, а уровень гоХ2 остается таким же, что и в слюнных железах. Наибольшее влияние нуль-мутаций по гену *Chd1* обнаружено в головах 4-х и 10-дневных имаго. Уровень экспрессии днРНК гоХ1 увеличен в 3.9 и 3.4 раза соответственно, а для гоХ2 показано достоверное снижение экспрессии в головах с возрастом по сравнению с контрольными особями.

Для изучения влияния хроматин-ремоделирующего фактора CHD1 на процесс ДК нами проводилось сравнение профилей экспрессии X-хромосомных и аутомсомных генов у личинок дикого типа и *Chd1* нуль-мутантов обоих полов полученных методом РНК-секвенирования. Обработка данных проводилась рядом программ (FastQC, Trimmomatic, Salmon), а для анализа дифференциальной экспрессии и визуализации использовали Bioconductor RStudio. Были получены графики плотности распределения значений log2Fold для дифференциальной экспрессии генов X-хромосом и аутомсом групп сравнения “самцы *Chd1* и самцы дикого типа” и “самки *Chd1* и самки дикого типа”. Для X-хромосомных генов по сравнению с аутомсомными у самцов мутантных по гену *Chd1* показан достоверный сдвиг в распределении плотности в сторону уменьшения экспрессии, тогда как у самок не наблюдается существенных изменений на фоне данной мутации.

Мы можем предположить, что фактор CHD1 вовлечен непосредственно в регуляцию экспрессии генов, связанную с ДК и/или необходим для поддержания хроматиновой структуры при ДК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-04-00864).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ КЛЕТОК АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА И ОСТЕОБЛАСТОВ ПРИ ПОМОЩИ РАЗЛИЧНЫХ ПОДХОДОВ СКОРОСТРЕЛЬНОЙ ПРОТЕОМИКИ С ИОННОЙ ПОДВИЖНОСТЬЮ

А. А. Лобов^{1,*}, И. А. Тараскин², Н. В. Боярская³, Д. А. Костина¹, А. А. Хижина¹, П. Е. Клаузен¹, А. А. Ивашкин², К. Н. Постникова¹, С. А. Божкова⁴, Р. М. Тихилов⁴, А. П. Середа⁴, В. В. Карелкин⁴, А. Б. Малашичева¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Физтех-школа биологической и медицинской физики, Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

³ФГБУ “НМИЦ им. В.А. Алмазова” Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ФГБУ “НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена” Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: lobov@incras.ru

Кальцинирующий аортальный стеноз (КАС) — это один из наиболее распространенных приобретенных пороков сердца. Единственным существующим методом лечения КАС является хирургическая замена клапана. Одна из причин отсутствия терапии заключается в недостаточном понимании молекулярных механизмов

мов эктопической кальцификации аортального клапана. Открытым остается вопрос, насколько механизмы эктопической кальцификации аналогичны процессам нормальной оссификации. Известно, что развитие КАС связано с остеогенной дифференцировкой интерстициальных клеток аортального клапана (ИКК). Мы провели сравнительный анализ молекулярных механизмов остеогенной дифференцировки ИКК (эктопическая кальцификация) и остеобластов (нормальная оссификация) человека. Для этого клетки культивировали в стандартных условиях и на 11-й день после индукции остеогенной дифференцировки проводили протеомный анализ полученных образцов.

Методы скорострельной протеомики активно развиваются и на смену классической data dependent acquisition (DDA) протеомики пришли data independent acquisition (DIA) подходы. В литературе пока представлены только единичные работы по сравнению методов DDA и DIA протеомики с ионной подвижностью в режиме PASEF на платформе TimsToF Pro (Bruker). Чтобы сравнить эти подходы и получить максимально возможное покрытие протеома мы проанализировали полученные образцы в режиме DDA-PASEF и DIA-PASEF. Анализ данных DIA-PASEF проводили в двух вариантах, с использованием специально полученной нами библиотеки спектров или воссоздав такую библиотеку по базам данных. Таким образом, мы получили три типа протеомных данных.

Для анализа мы использовали только белки, идентифицированные не менее чем по двум пептидам. В общей сложности, эти белки соответствовали 4126 генам. Только половина этих белков была идентифицирована всеми тремя методами. Аналогичные результаты демонстрируют и данные анализа дифференциальной экспрессии между изучаемыми биологическими группами — большая часть обнаруженных дифференциальных белков была обнаружена только одним из методов. Таким образом, эти методы скорее комплементарны, а не взаимозаменяемы.

Мы выявили существенные различия в протеомных профилях между ИКК до и после остеогенной дифференцировки, а также между ИКК и остеобластами. При этом мы обнаружили слабые изменения протеомного профиля остеобластов в ходе дифференцировки. Эти различия связаны с биосинтезом жирных кислот что, по-видимому, отражает изменения в физиологии этих клеток.

ИКК, выделенные от пациентов с КАС, как до, так и после остеогенной дифференцировки сохраняют значительные отличия от остеобластов. Основные различия связаны с метаболическими каскадами (в особенности с метаболизмом аминокислот) и сигнальными путями JAK-STAT и AGE-RAGE. Вероятно, они могут стать перспективными мишенями для направленного подавления эктопической кальцификации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-14-00152-П.

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ГИСТОНОвого КОДА ПРИ ДИСРЕГУЛЯЦИИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В ЭНДОТЕЛИИ

А. А. Лобов¹, Д. А. Переплетчикова¹, Д. А. Костина¹, Е. А. Репкин^{1,*}, Б. Р. Зайнуллина², А. Б. Малашичева¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: erepkin53@gmail.com

Эндотелий сосудов не только способен воспринимать целый ряд разнообразных стимулов, включая механическое напряжение, но может также передавать различные сигналы клеткам близкорасположенных тканей, модулируя их физиологическое состояние. Нарушение данных процессов может приводить к ряду патологий: например, напряжение сдвига, возникающее в результате одностороннего давления кровотока на клетки эндотелия, может провоцировать развитие эктопической кальцификации сердечно-сосудистой системы.

Notch-рецепторы способны реагировать на механическое воздействие на клетки: показана связь Notch-сигналинга как с напряжением сдвига, так и с патологической кальцификацией кровеносных сосудов и клапанов сердца. Тем не менее, тонкие особенности молекулярных механизмов, приводящих к данным нарушениям, остаются во многом невыясненными. В нашей работе мы проанализировали посттрансляционные модификации гистонов в эндотелиальных клетках человека при гиперактивации пути Notch, чтобы исследовать, как данный тип сигналинга и его нарушения могут воздействовать на эпигенетическую регуляцию в клетках стенок сосудов.

Нами была выполнена лентивирусная трансдукция конструкции для оверэкспрессии внутриклеточного домена Notch 1 (NICD) в эндотелиальные клетки пупочного канатика человека (HUVeC). Далее мы выделили гистоны из клеток с активированным Notch-сигналингом и контрольных клеток и провели их анализ с использованием методов скорострельной протеомики.

Масс-спектрометрия позволила выявить ряд посттрансляционных модификаций белков, из которых наиболее заметной в случае гистонов можно назвать ацетилирование N-конца. По результатам статистиче-

ской обработки данных нам удалось выявить 21 N-ацетилированный пептид, уровень дифференциальной экспрессии которых достоверно отличался между группами сравнения. Из них 9 были идентифицированы как различные типы гистона 1: H1-5, H1-3, H1-0, H1-4, H1-10. Посттрансляционные модификации данного вида гистонов изучены в незначительной степени, однако известно, что они также играют роль в эпигенетической регуляции экспрессии некоторых генов.

Можно заключить, что оверэкспрессия Notch-сигналинга может приводить к изменениям в эпигенетической регуляции в клетках эндотелия человека. Более подробное изучение функций генов, регуляция которых осуществляется за счет ацетилирования гистона 1, и их роли в развитии патологий требует дальнейших исследований.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (проект № 20-74-10077).

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УРОВНЮ ЭКСПРЕССИИ МЕМБРАННЫХ МАРКЕРОВ

И. С. Малахов^{1,*}, О. А. Шашкова¹, Л. А. Терехина¹, К. О. Авров¹, И. В. Смирнов^{1,2},
А. Ю. Столбовая^{1,2,3}, М. П. Самойлович^{1,4}

¹Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова, Санкт-Петербург, Россия

²Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ipatyi.malakhov@yahoo.com

Опухолевые клетки несут на своей поверхности маркерные молекулы, которые отсутствуют или низко экспрессированы на нормальных клетках. Создание ряда препаратов для диагностики и терапии опухолевых заболеваний основано на использовании меченных радионуклидами молекул, способных аффинно связывать опухолевые мишени. Тестирование таких меченых аффинных препаратов в условиях *in vitro* или на животных требует наличия линий культивируемых опухолевых клеток, несущих молекулы-мишени. При этом важно иметь коллекцию линий, которые бы различались по количеству молекул-мишеней на мембране.

Методами геной инженерии на основе ретровирусного вектора рQСХР создано несколько плазмид. Каждая плазида содержит ген, кодирующий химерный мембранный белок. Химерный белок содержит флуоресцентную цитоплазматическую часть, а также экстраклеточную часть, соответствующую экстраклеточной части маркера опухоли. Были созданы плазмиды, кодирующие экстраклеточную часть рецептора соматостатина SSTR2, рецептора эпидермального фактора роста HER2-*neu*, простатспецифического мембранного антигена PSMA, а также маркера пролиферирующих клеток эндотелия CD105.

С помощью полученных плазмид на основе опухолевых клеточных линий мышей и крыс в качестве реципиентов генетического материала начато создание рекомбинантных клеточных линий, которые различаются по уровню экспрессии целевых молекул-мишеней. Селекция клеток проводится посредством отбора клеточных клонов, различающихся по интенсивности флуоресценции. Поскольку флуоресцирует только химерная молекула антигена, то интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна количеству антигена на поверхности клетки. Полученные клеточные линии будут использованы для *in vitro* и *in vivo* тестирования меченных радиоактивными изотопами анти-CD105 антител, анти-HER2-*neu* наноантител, а также пептидов, аффинно связывающихся с PSMA и SSTR2 соответственно.

РАЗЛИЧИЯ ГЕНОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ *FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII* ИЗ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА И ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ

М. И. Маркелова^{1,*}, М. Н. Сиягина¹, Н. А. Данилова¹, А. Х. Одинцова², С. Р. Абдулхаков^{1,3},
Р. А. Абдулхаков³, Т. В. Григорьева¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан, Казань, Россия

³Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

*E-mail: mimarkelova@gmail.com

Микробиом пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) характеризуется снижением представленности вида *Faecalibacterium prausnitzii*, который является одним из доминирующих представи-

телей сообщества микробиоты кишечника. В настоящее время предлагается использовать *F. prausnitzii* в качестве пробиотика при различных заболеваниях, однако имеется мало научных данных о генетическом разнообразии данного микроорганизма.

Целью исследования явилось выявление генетического разнообразия *F. prausnitzii* из микробиоты пациентов с ВЗК и здоровых контролей.

Тотальная ДНК была выделена из кала 37 пациентов с язвенным колитом (ЯК), 35 пациентов с болезнью Крона (БК) и 42 здоровых контрольных лиц. Метагеномное секвенирование было произведено на платформе NextSeq 500. Геномное профилирование на уровне штаммов проводилось с помощью программы PanPhlAn3 с использованием базы данных референсных геномов *F. prausnitzii*.

Штаммы *F. prausnitzii* были обнаружены в микробиоте 40 здоровых контрольных лиц, 28 пациентов с БК и 26 пациентов с ЯК. Методом *k*-средних на основе наличия генов были выявлены 2 кластера, характеризующих генетическое разнообразие *F. prausnitzii*. Установлено, что частота встречаемости штаммов от пациентов с БК и ЯК в I кластере достоверно выше (82.1 и 80.8% от всех штаммов пациентов соответственно), чем от контрольной группы – 50% ($p < 0.05$, точный кр. Фишера). II кластер преимущественно представлен штаммами здоровых контролей (50% от всех контрольных штаммов, 17.9% штаммов от пациентов с БК и 19.2% – от пациентов с ЯК).

Геномы *F. prausnitzii* из I кластера (кластера ВЗК) достоверно отличаются пониженной частотой встречаемости 1739 генов и повышенной частотой встречаемости 375 генов ($p < 0.05$, точный кр. Фишера). Установлено, что ген γ -глутамил- γ -аминобутиратгидролазы, участвующей в синтезе 4-аминобутирата, достоверно реже выявляется у штаммов из кластера ВЗК. 4-аминобутират является субстратом для продукции бутирата, обладающего противовоспалительными свойствами. Кроме того, установлено, что гены, участвующие в синтезе клеточной стенки бактерий, также имеют сниженную частоту встречаемости в кластере ВЗК, тогда как гены, участвующие в распаде пептидогликана, имеют повышенную частоту. Таким образом, эти изменения могут приводить к истончению клеточной стенки и нарушению ее барьерной функции.

Метагеномное профилирование на уровне штаммов выявило, что *F. prausnitzii* из микробиоты пациентов с ВЗК, вероятно, продуцирует меньшее количество бутирата, и имеет нарушенную клеточную стенку, в отличие от штаммов контролей. Таким образом, *F. prausnitzii* от здоровых доноров потенциально может использоваться в качестве пробиотиков нового поколения для облегчения симптомов ВЗК.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (№ 0671-2020-0058).

ДОЛГОСРОЧНЫЕ ПОСТСТРЕССОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ГИППОКАМПЕ КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ВОЗБУДИМОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Е. Ю. Маянова^{1,*}, И. Г. Шалагинова¹, Н. А. Дюжикова²

¹Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: kate7501@mail.ru

Гиппокамп – структура в головном мозге, отвечающая за консолидацию памяти, эмоциональную регуляцию. Последние исследования показывают, что хронический стресс оказывает неблагоприятное воздействие на гиппокамп и может стать причиной нейровоспаления. Это приводит к нарушению нейрогенеза, усилению нейродегенерации и снижению когнитивных функций. Однако механизмы и динамика таких постстрессорных изменений до конца не ясны, не известны генетические факторы, делающие организм более уязвимым к постстрессорным нарушениям.

Цель данной работы: оценить долгосрочные изменения экспрессии генов провоспалительных цитокинов гиппокампе в модели постстрессорной патологии у двух линий крыс, различающихся по уровню возбудимости нервной системы.

Эксперименты были выполнены на взрослых самцах крыс с высоким и низким порогом возбудимости. Анализировали временные точки: 1, 7, 24 и 60 дней после стресса. Контрольные группы крыс (одна с высоким (ВП), другая с низким (НП) порогом возбудимости) содержали в стандартных условиях. Экспериментальные группы (НП и ВП) подвергали длительному эмоционально-болевым стрессорному воздействию по Гехту. Использование двух линий крыс, различающихся по уровню возбудимости, позволяют оценить роль индивидуальных особенностей нервной системы в реакции на психоэмоциональное воздействие.

После декапитации из мозга извлекали гиппокамп и выделяли суммарную РНК (extractRNA, Eurogen). Для оценки уровня продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF- α) проводилась обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени.

Согласно полученным данным, животные с низкой и высокой возбудимостью имеют характерные особенности в динамике экспрессии провоспалительных сигналов. Высоковозбудимые животные имеют более генерализованную долгосрочную провоспалительную реакцию на стресс. Таким образом, генетически обусловленная возбудимость нервной системы является многообещающим маркером индивидуальной уязвимости к стрессу, поскольку она влияет на тяжесть и динамику постстрессового нейровоспаления.

АНАЛИЗ РЕПЕРТУАРА И ЭКСПРЕССИИ ПОВТОРОВ В ГЕНОМЕ ПЧЕЛ *APIS MELLIFERA*

В. Д. Мельниченко^{1,*}, Л. С. Огорокова², Н. В. Панюшев², Л. С. Адонин³

¹Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

²Институт биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия

³Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

*E-mail: vasilinamelnichenko01@gmail.com

Медоносная пчела (*A. mellifera*) – эусоциальное перепончатокрылое насекомое, ее семьи разделены на касты, каждая из которых выполняет в улье определенную роль. К размножению способны только матки, остальные особи женского пола являются рабочими пчелами, то есть выполняют обязанности по уходу за приплодом и добыче пропитания. Несмотря на то, что процесс определения касты и регулирующие этот процесс гены достаточно хорошо изучены, роль некодирующих элементов генома остается не до конца понятной. Примерно 11% генома пчел составляют повторяющиеся элементы, они играют центральную роль в стабильности хромосом, клеточном цикле, регуляции экспрессии генов и являются важным субстратом для эволюции генома.

Цель данной работы – определить роль повторяющихся элементов генома в процессе определения каст личинок пчел.

Сначала в геноме *A. mellifera* был произведен *de novo* поиск и классификация повторяющихся последовательностей. Пчелиный геном содержит меньшую долю транспозонов и меньшее их разнообразие по сравнению с другими представителями отряда насекомые (например, шмелем *B. terrestris* и *D. melanogaster*). Ведущим классом транспозонов оказались ДНК-транспозоны (Mariner и Tc1), при этом анализ дивергенции отдельных копий свидетельствует об относительно недавней экспансии ДНК-транспозонов семейства Mariner.

Некоторые транспозоны потенциально могут экспрессироваться и участвовать в регуляции развития каст, быть источником некодирующих РНК. Для изучения роли повторов в этом процессе был произведен bulk RNA-seq анализ мозга рабочих пчел и маток. Некоторые повторы показали достаточно высокий уровень экспрессии, в основном это ранее не описанные повторы, а также ДНК-транспозоны СМС-EnSpm. При этом значительных различий в паттернах экспрессии повторов между матками и рабочими пчелами обнаружено не было.

Отсутствие различий в паттернах экспрессии повторов может быть вызвано усреднением уровней экспрессии по всем клеткам. Поэтому для изучения экспрессии повторов в популяциях клеток мозга пчел был проанализирован single cell RNA-seq датасет.

Результаты этой работы позволят нам улучшить понимание роли некодирующих последовательностей (в частности повторов) в регуляции образования каст и, следовательно, расширить знания генетических механизмов эусоциального поведения медоносных пчел.

ОЦЕНКА ПЕРМИССИВНОСТИ И НАРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ VSV НА ПАНЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПЛАТФОРМЫ НАПРАВЛЕННОЙ ЭВОЛЮЦИИ VSV

В. Д. Мороз^{1,*}, А. В. Карабельский¹, А. С. Малоголовкин¹, А. Д. Егоров¹, Н. Б. Гасанов¹

¹АНО ВО “Университет “Сириус”, Сириус, Россия

*E-mail: vasilium@list.ru

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности в развитых странах. Иммуноterapia является действенным методом, позволяющим увеличить эффективность лечения онкологических заболеваний, однако недостаточная иммуногенность опухолевых клеток и недостаточное проникновение иммунокомпетентных клеток в ткань опухоли снижают ее эффективность. Для преодоления этого

препятствия перспективным подходом является использование онколитических вирусов, созданных, например, на основе вируса везикулярного стоматита (VSV), специфично размножающегося в опухолевых клетках, что, помимо лизиса опухолевых клеток, запускает воспалительную реакцию в опухолевом очаге и активирует иммунную систему.

Методы генной инженерии позволяют создать рекомбинантные варианты VSV, в геном которых между генами гликопротеина и большой полимеразы VSV, может быть встроены чужеродный ген, продукт экспрессии которого воздействует на иммунные клетки для более выраженной стимуляции противоопухолевого ответа (например, гены, кодирующие провоспалительные цитокины, хемокины и т.д.), а также вносить в геном вируса мутации, направленные на увеличение онкоселективности.

Отдельный интерес представляет изучение возможности применения онколитиков на основе VSV для лечения рака головы и шеи (РГШ), как одного из наименее изученных в данном направлении терапии. Рак головы и шеи занимает 6-е место по распространенности в России, и ежегодно выявляется более 24 тысяч новых случаев. Этот вид рака также является пятым по количеству летальных исходов в течение года от момента установления диагноза.

Общей целью исследования является получение инновационных рекомбинантных онколитиков на основе VSV, которые будут эффективны при лечении широкого спектра онкологических заболеваний как за счет увеличения онкоспецифичности, так и за счет рациональных модификаций вирусного генома. Для этого на начальном этапе работ необходимо было создать лабораторный процесс получения VSV и оценить перmissивность рекомбинантных онколитиков на панели доступных раковых клеточных линий, включая линии РГШ.

В ходе выполнения работы была отработана лабораторная процедура получения VSV без использования желперного вируса, что значительно упрощает процесс наработки, а также был отработан метод оценки вирусного титра по цитопатическому действию. Было проведено сравнение перmissивности VSV на различных клеточных линиях, включая линию РГШ (SCCVII) и продемонстрирована разница в чувствительности клеток к проникновению VSV, а также проведена оценка влияния на эффективность репликации вируса и его перmissивность мутации гена матричного белка $\Delta M51$, которая по исследованиям ведущих научных лабораторий способствует аттенуации VSV в здоровых клетках.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ОТВЕТ НА СТРЕСС В КРОВИ У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ВОЗБУДИМОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

С. А. Новожилова^{1,*}, И. Г. Шалагинова¹, Н. А. Дюжикова²

¹Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: loutimase@gmail.com

Интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-1 β (IL-1 β) и фактор некроза опухоли (TNF- α) являются важнейшими провоспалительными цитокинами, продуцируемыми иммунокомпетентными клетками крови, астроцитами и микроглией. Стресс оказывает влияние на уровень экспрессии генов цитокинов, вследствие чего повышается уровень воспалительных сигналов в крови. Выраженное нейровоспаление в ответ на стресс связано с поведенческими симптомами тревоги и депрессии. Таким образом, IL-1 β , IL-6 и TNF- α являются потенциальными маркерами выявления тяжести периферического постстрессорного воспаления и поведенческих расстройств.

Существуют определенные факторы риска, делающие организм более чувствительным к постстрессорным расстройствам. Наследственно обусловленный уровень возбудимости нервной системы возможно является одним из таких факторов.

Цель: оценить динамику изменения экспрессии генов провоспалительных цитокинов в крови в модели постстрессорной патологии у двух линий крыс, различающихся по уровню возбудимости нервной системы.

В исследовании использовались взрослые самцы крыс с низким и высоким порогом возбудимости. Экспериментальные группы животных (одна с высоким "ВП", другая с низким "НП" порогом возбудимости) подвергали длительному эмоционально-болевого воздействию по Гехту. Контрольные группы животных (НП и ВП) не стрессировали. Забор крови проводился в нескольких временных точках: 1, 7, 24 и 60 дней после окончания стрессирования.

Сбор крови проводился при декапитации и суммарную РНК выделяли из сыворотки (extractRNA, Eurogen). Для оценки уровня продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF- α) проводилась обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени.

Согласно полученным данным, в периферической крови высоко возбудимых крыс спустя 24 часа после стрессирования значительно повышается уровень экспрессии генов $\text{IL-1}\beta$ по сравнению с контролем. Также через 60 дней снижается уровень экспрессии IL-6 . Что касается низко возбудимых крыс, значимых различий с контролем не было обнаружено. Наличие специфических изменений в экспрессии провоспалительных цитокинов в ответ на стресс у высоко возбудимых животных позволяет считать генетически детерминированную возбудимость нервной системы перспективным маркером индивидуальной уязвимости к стрессу.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ Hi-C И FISH ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ХРОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В КЛЕТКАХ ЛИНИИ ЭРИТРОБЛАСТОВ КУРИЦЫ HD3

В. А. Плотников^{1,*}, А. В. Маслова¹, М. А. Нуриддинов², М. М. Гридина², В. С. Фишман², А. В. Красикова¹

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

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: gidrovova@yandex.ru

Полногеномный метод захвата конформации хроматина (Hi-C) широко применяется для анализа пространственной организации генома, а также для уточнения сборок геномов и исследования хромосомных перестроек при опухолевой трансформации клеток разных типов. Линия эритробластов курицы HD3, трансформированных вирусом эритробластоэмии птиц, является удобной моделью для изучения процессов эритроидной дифференцировки у птиц *in vitro*. Однако кариотип данной иммортализованной клеточной линии до настоящего времени систематически не исследован, хотя, как известно, хромосомные перестройки могут вызывать существенные изменения экспрессии генов и влиять на фенотип клетки.

В настоящей работе для выявления структурных перестроек хромосом и изменений кариотипа мы использовали визуальный анализ тепловой Hi-C карты взаимодействий геномных локусов, полученной для клеток линии HD3. Отличия в структуре внутри- и межхромосомных взаимодействий на Hi-C карте клеток HD3 по сравнению с эмбриональными фибробластами мы интерпретировали как свидетельство хромосомной перестройки. В результате мы обнаружили порядка 15 производных хромосом, возникших в результате межхромосомных транслокаций. В частности, различные фрагменты хромосомы 4 были обнаружены в составе трех производных хромосом, при сохранении нормальной хромосомы 4. Производную хромосомы 4 $\text{der}(4)$ образовали содержащий центромеру фрагмент 4q, а также хромосомы 6 и 19; в составе $\text{der}(5)$ обнаруживались сама хромосома 5 и фрагменты 4p и 7p; $\text{der}(17)$ включала в себя 4q и хромосому 17. Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) мы верифицировали состав производных хромосом, а также подтвердили наличие дубликации половой хромосомы W в кариотипе линии HD3. Помимо этого, гибридизация зондов к тандемным повторам СММ и РО41 позволила выявить новые кластеры повторов в составе производных хромосом 4 и 5, что не является характерным для хромосом 4 и 5 нормального кариотипа. При анализе Hi-C карты были также обнаружены немногочисленные случаи внутривхромосомных перестроек, представленные, в основном, делециями. Таким образом, мы продемонстрировали преимущество метода Hi-C для аннотации структурных изменений хромосом у птиц, которую сложно осуществить с использованием цитогенетического анализа кариотипа и дифференциального окрашивания в связи с наличием большого количества микрохромосом. С помощью метода Hi-C мы выявили многочисленные хромосомные перестройки в эритроблестах линии HD3, которые нехарактерны для других клеточных линий птиц, в том числе полученных из индуцированных вирусами опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-74-20075) с использованием оборудования ресурсного центра “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ. Расшифровку Hi-C библиотек проводили на базе Центра коллективного пользования в области геномики Сколтеха.

ЭФФЕКТ ЭКЗОГЕННОГО ЛАКТОФЕРРИНА НА МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК У 15-ДНЕВНЫХ ЭМБРИОНОВ МЫШИ, РАЗВИВШИХСЯ ИЗ ЗИГОТ, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ БИСФЕНОЛА А

Л. А. Постникова^{1,*}, И. О. Сучкова¹, Е. М. Нониашвили¹, Е. Л. Паткин¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ofeliyafutman@gmail.com

Становится все более очевидным, что изменения в эпигенетических путях, происходящие в раннем развитии, связаны с различными заболеваниями взрослого человека. Кроме того, есть некоторые доказательства корреляции между эпигенетическими модификациями и окислительным стрессом в раннем эмбриогенезе.

Внешние факторы (например, бисфенол А (БФА)) вызывают окислительный стресс, который изменяет характер метилирования ДНК и, возможно, другие эпигенетические признаки. Таким образом, против вредного действия БФА можно использовать фармацевтические препараты на основе природных или синтетических антиоксидантов. Лактоферрин (ЛФ) является важным многофункциональным белком, содержащимся в грудном молоке и других экзокринных жидкостях, который обладает уникальными антиоксидантными свойствами и может снижать образование активных форм кислорода (АФК).

В связи с вышесказанным, целью данной работы являлось изучение антитоксического действия ЛФ на эпигенетический статус 15-дневных эмбрионов мышей, подвергшихся внутриутробному воздействию БФА. В этом исследовании мышам в первый день беременности однократно вводили: 40 мг/кг массы тела БФА; 50 мг/кг массы тела ЛФ или 50 мг/кг массы тела ЛФ с последующей инъекцией 40 мг/кг массы тела БФА. На 15-й день эмбрионального развития оценивали уровень метилирования ДНК в различных зачатках первичных органов.

Установлено, что у 15-дневных эмбрионов мышей воздействие БФА в пренатальном периоде вызывает повышенный уровень полногеномного метилирования ДНК, причем наиболее выраженный эффект наблюдается в зачатке головного мозга. В совокупности наши результаты показали, что введение ЛФ в дозе 50 мг/кг массы тела приводит к нормализации уровней метилирования ДНК по всему геному после индуцированных БФА эпигенетических нарушений. Таким образом, мы предполагаем, что ЛФ может частично нейтрализовать вредное воздействие БФА в отношении aberrантного метилирования и, таким образом, потенциально может служить доступным фармацевтическим продуктом. Результаты исследования могут помочь в разработке новых терапевтических подходов, но необходимы дальнейшие исследования для характеристики АФК и/или антиоксидантных ферментов после воздействия БФА, ЛФ и ЛФ + БФА.

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ СВЯЗИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА И ГЕННОЙ ЭСПРЕССИИ В ЛОКУСЕ *SLC29A3/UNC5B* МЫШИ

П. А. Сальников^{1, 2, *}, А. П. Ян^{1, 2}, Я. К. Степанчук^{1, 2}, Э. С. Валеев², С. А. Тихомиров¹,
П. С. Белокопытова^{1, 2}, В. С. Фишман^{1, 2}

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: paul.salnikov@gmail.com

Пространственная укладка хроматина в интерфазном ядре не является случайной: каждая хромосома по своей длине организована в топологически ассоциированные домены, или ТАДы. ТАДы представляют собой участки ДНК с повышенным количеством внутренних пространственных контактов и инсупляцией от геномного окружения, и формируются взаимодействием активностей комплекса когезина, экструдирующего хроматиновые петли, и кластеров сайтов связывания белка CTCF, блокирующих такую экструзию. ТАДы консервативны в эволюции, и предполагается, что они вовлечены в регуляцию генной экспрессии через направление взаимодействий регуляторных цис-элементов. Однако, полная деплеция CTCF не приводит к масштабной дисрегуляции генной экспрессии, и случаи значимого изменения уровня экспрессии генов при локальной реорганизации пространственной организации хроматина крайне редки. Таким образом, остается непонятым понимание механизмов регуляции генной экспрессии. Мы полагаем, что в зависимости от локального эпигенетического статуса хроматина и онтогенетической истории клетки, влияние структуры ТАДов на экспрессию генов может различаться. Соответственно, в этой работе мы поставили себе в качестве цели проверку гипотезы о тканеспецифичности влияния локальной пространственной реорганизации генома в локусе *Slc29a3/Unc5b* мыши на экспрессию генов этого локуса.

Локус *Slc29a3/Unc5b* мыши характеризуется высоким уровнем инсупляции между двумя соседними ТАДами, содержащими гены *Unc5b*, *Slc29a3*, *Cdh23*, *Vsir*, *Psap*, *Sgpl4*, в большинстве своем конститутивно экспрессирующимися в различных тканях и выполняющих витальные функции в развитии и жизнедеятельности организма. С помощью технологии CRISPR/Cas9 мы получили модельную линию мышей (на основе линии C57Bl/6), несущих делецию кластера сайтов связывания CTCF между генами *Slc29a3* и *Unc5b*, приведшую к отсутствию связывания CTCF в модифицированных сайтах. В ряде органов гибридов между мышами полученной линии или мышами дикого типа и *Mus musculus castaneus* путем цифровой ПЦР на системе Qiagen (Qiagen) мы провели аллель-специфичное определение экспрессии генов локуса. Последствия внесенной модификации оценивались нами как различия в отношениях концентраций аллелей CAST и C57Bl/6 (мутантных и дикого типа).

Статистически значимые изменения генной экспрессии были обнаружены в менее чем половине исследованных типах тканей, а сами изменения в подавляющем большинстве случаев не превышали 25%. Тем не менее, мы обнаружили 2 случая разнонаправленных изменений (экспрессия *Slc29a3* в почках снизилась на 25%, в то время как в мозжечке она повысилась на 20%; экспрессия *Vsir* в обонятельных луковицах упала на 20% и уве-

личилась на 10% в мочевом пузыре). Мы выбрали эти органы для следующего более детализированного анализа с целью установить эпигенетическую природу таких различий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 22-14-00247) и Министерства образования и науки РФ, грант № 2019-0546 (FSUS-2020-0040).

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ МЕТАГЕНОМНЫМИ И МЕТАБОЛОМНЫМИ ПАРАМЕТРАМИ УСЛОВНО ЗДОРОВОЙ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА

А. М. Сенина^{1,*}, Д. Р. Хуснутдинова¹, М. И. Маркелова¹, Е. А. Булыгина¹, М. Н. Синягина¹, О. В. Куприянова¹, Л. Ш. Нигматуллина¹, Г. Э. Сынбулатова¹, А. Ф. Муллахметова¹, Т. В. Григорьева¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: anastasiahm@list.ru

Кишечная микробиота — это сложное сообщество микроорганизмов, которое развивается на протяжении всей жизни, а также имеет сильное влияние на организм хозяина. Неправильное питание, малоактивный образ жизни, зависимость от курения, чрезмерная гигиена, а также использование антибиотиков для борьбы с инфекционными заболеваниями приводят к уменьшению численности потенциально полезных бактериальных родов в кишечнике человека. Подобное уменьшение считается причиной высокой распространенности метаболических нарушений, включая ожирение, неалкогольную жировую болезнь печени, сахарный диабет 2 типа и сердечно-сосудистые заболевания. На данный момент нет эффективной терапии, которая могла бы обеспечить долговременный сдвиг бактериального состава кишечного микробиома, а также нет понимания насколько стабильна микрофлора кишечника здорового человека. Целью нашего исследования является изучение стабильности профилей микробиома кишечника человека.

В настоящем исследовании представлены данные сравнительного анализа 17 условно здоровых добровольцев, образцы кала которых отбирались на протяжении одного года каждые два месяца ($n = 6$). Для анализа микробиоты выделяли ДНК из образцов с использованием набора MP FastDNA Spin Kit for Feces, проводили подготовку метагеномных библиотек и секвенирование v3–v4 региона гена 16S рРНК на платформе Illumina MiSeq. Полученные риды были проанализированы с помощью программы QIIME v.1.9.1 с использованием референсной базы данных GreenGenes 13.8 с 97%-ным порогом сходства между последовательностями. Количество короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) в кале условно-здоровых добровольцев оценивалось методом газовой хроматографии на приборе Clarus 680 (PerkinElmer).

Внутрииндивидуальный состав и структура микробиоты кишечника отдельных участников исследования в разных точках характеризуется меньшими различиями, чем между индивидуумами. Однако, несмотря на индивидуальные паттерны, доля преобладающих бактериальных таксонов и индекса Шеннона могут сильно варьировать в течение года. В данном исследовании после антимикробной терапии у одного из участников эксперимента уменьшилась доля родов *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium*, *Collinsella*, *Bulleidia* и увеличивалась доля родов *Blautia* и *Ruminococcus*. Анализ результатов корреляционного анализа между количеством КЖК в кале и составом кишечного микробиома показал сильную положительную корреляцию для семейств Prevotellaceae, о. Actinomycetales f. АСК.М1, Carnobacteriaceae, Succinivibrionaceae, Neisseriaceae, отрицательную для семейств Christensenellaceae, Eubacteriaceae.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (проект № 0671-2020-0058).

ВЛИЯНИЕ IGA НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ КОММЕНСАЛЬНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI*

М. Н. Синягина^{1,*}, И. А. Байчурина¹, М. И. Маркелова¹, Я. К. Семин², А. А. Круглов^{2,3}, Д. С. Матюшкина⁴, В. А. Мусарова⁴, Т. В. Григорьева¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Немецкий исследовательский центр ревматизма, Институт Лейбница, Берлин, Германия

⁴НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия

*E-mail: marias25@mail.ru

Болезнь Крона (БК) является хроническим аутоиммунным заболеванием, характеризующимся увеличением доли *Escherichia coli* в микробиоте кишечника и сопровождающимся повышением уровня секреции иммуноглобулина А (IgA) в слизистой оболочке кишечника.

Целью исследования было оценить влияние IgA на комменсальный штамм *E. coli* 1_39_1, выделенный из фекалий здорового донора и близкородственный пробиотическому штамму *E. coli* Nissle 1917 (EcN).

Суспензию *E. coli* 1_39_1 инкубировали с IgA (600 мкг), а также с 2%-ным бычьим сывороточным альбумином и фосфатно-солевым буфером (контроли) в течение двух часов при комнатной температуре в трех биологических повторностях. Тотальную РНК из образцов выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции, а затем обрабатывали ДНКазой I. Для деплеции рРНК использовали набор NEBNext rRNA Depletion kit для бактерий. Библиотеку мРНК готовили с использованием набора для подготовки библиотеки РНК NEBNext Ultra II. Секвенирование проводили на платформе NextSeq 500 Illumina. Полученные нуклеотидные последовательности были картированы на референсный геном штамма *E. coli* 1_39_1 (GCA_008041535.1) с использованием Bowtie2 и подсчитаны с помощью featureCounts. Дифференциальную экспрессию генов анализировали с помощью DESeq2 в среде R.

В данном исследовании обработка IgA штамма *E. coli* приводит к достоверному изменению экспрессии 218 генов ($p < 0.05$). Особый интерес представляет значимое увеличение экспрессии генов, кодирующих фактор устойчивости в сыворотке (ISS), белки адгезии, инвазии и образования везикул, белков подвижности бактерий и синтеза О-антигена. Кроме того, обработка IgA стимулирует деление бактериальных клеток. В то же время, происходит снижение экспрессии генов кластера, кодирующего компоненты системы продукции колибактина. Несмотря на генотоксические свойства колибактина, показано, что делеция генов острова приводит к снижению антагонистических свойств *E. coli* Nissle 1917 и его пробиотического эффекта.

Таким образом, воздействие IgA на комменсальный штамм *E. coli* приводит к увеличению экспрессии факторов вирулентности бактерии, таких как адгезия, инвазия, подвижность и стимуляция иммунной системы, которые способствуют выживанию бактерии и успешной колонизации кишечника. Вероятно, помимо дисбаланса в бактериальном сообществе, у пациентов с БК происходят изменения взаимодействия комменсальных бактерий с иммунной системой человека, что приводит к повышению их вирулентных свойств.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (проект № 0671-2020-0058).

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ФАКТОРА СБОРКИ И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА CHD1 В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ ГЕНОВ В СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗАХ В ХОДЕ РАЗВИТИЯ *D. MELANOGASTER*

А. В. Торошина^{1, *}, А. Ю. Конев¹

¹ФГБУ Петербургский институт ядерной физики НИЦ “Курчатовский институт”, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: toroshchina_av@npfi.nrcki.ru

CHD1 (*Chromodomain-Helicase DNA-binding 1*) – это консервативный АТФ-зависимый хроматин-ремоделирующий фактор. Хроматин-ремоделирующие факторы необходимы для преобразований хроматина в процессах реализации генетической информации. Впервые было показано участие белка CHD1 дрозофилы не только в ремоделировании хроматина, но и в сборке хроматина *in vivo*.

Геном человека содержит два гомолога *CHD* (*CHD1* и *CHD2*), считающихся онкогенами. Как гомозиготные делеции гена *CHD1*, так и сверх-продукция белка CHD1 принимают непосредственное участие в процессах образования онкологических опухолей простаты, что делает этот фактор возможной терапевтической мишенью. Фактор CHD2 также вовлечен в процессы развития эпилепсии.

Сверхпродукция в клетках дрозофилы хроматин-ремоделирующих белков дикого типа и форм белков с нарушенной АТФ-азной активностью часто используется для исследования их функций и механизма действия. Ранее нами показано, что сверхэкспрессия в клетках слюнных желез личинок дрозофилы как нативной, так и каталитически неактивной форм белка CHD1 приводит к деформации и деконденсации определенных участков политенных хромосом, с которыми связывается белок CHD1 и РНК-полимераза II. Изменения морфологии хромосом при сверхэкспрессии отличаются от эффекта нуль-мутаций *Chd1*, где укорочение хромосомы и нарушение дисковой структуры наблюдается только для X-хромосомы самцов.

В данной работе с помощью метода *RT-qPCR* мы проанализировали влияние сверхпродукций исследуемых форм белка CHD1, а также нуль-мутаций гена *Chd1* на экспрессию ряда генов, специфических для слюнных желез, резко изменяющих уровень транскрипции в ходе развития (*Sgs4*, *Sgs5*, *ng2*, *ng3*, *Pig1* и *Eig71*). Все они расположены в участках хромосом, anomalно деконденсированных при сверхпродукции исследуемых форм CHD1. Мы показали, что особи со сверхпродукцией как белка CHD1 дикого типа, так и его каталитически неактивной формы проявляют достоверные отклонения от особей дикого типа в уровне экспрессии исследованных генов и динамике ее изменений в ходе развития. Для исследованных генов наблю-

дается сходный характер изменений транскрипции при сверхпродукции обеих форм белка, который не совпадает с эффектами нуль-мутаций *Chd1*. Таким образом, влияние сверхэкспрессии трансгенов *Chd1* и на структуру хромосом, и на транскрипцию исследованных генов связано с высокой концентрацией белка в клетке, а не его каталитической активностью.

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ РАСТЕНИЙ

П. А. Халецкая^{1, *}, Т. А. Здобнова¹, М. А. Гринберг¹, В. А. Воденев¹

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*E-mail: poly.h@mail.ru

Ионизирующее излучение (ИИ) оказывает существенное влияние на важнейшие физиологические процессы растений (фотосинтез, дыхание, дальний транспорт, гормональную систему, биосинтезы соединений). В природных условиях существенное значение также может иметь эффект ИИ на стрессовые сигналы, формирующие адаптацию к природным факторам. Один из значимых типов стрессовых сигналов растений – электрические сигналы (ЭС) – распространяющиеся изменения мембранного потенциала. ЭС возникают в ответ на различные раздражители (нагрев, механическое воздействие, охлаждение и др.). В результате распространения ЭС изменяется активность ряда физиологических процессов, включая фотосинтез, транспирацию, а также экспрессию генов. К настоящему времени показано, что ИИ способно оказывать эффект на параметры вызванных локальным стрессором ЭС: у облученных растений увеличивается амплитуда и скорости распространения. Одним из механизмов формирования эффектов ИИ является генетическая регуляция, запускаемая, главным образом, изменением содержания активных форм кислорода (АФК) под действием облучения. Генетическая регуляция основывается на изменении экспрессии генов, что обусловлено прямым (деструктивное действие ИИ) и косвенным (изменение активности транскрипционных факторов) влиянием ИИ. Регуляцией на уровне генома объясняется долговременность эффектов ИИ у облученных растений.

Исследования были выполнены на 15-дневных проростках пшеницы (*Triticum aestivum* L.). В качестве источника ИИ использовался β -излучатель ⁹⁰Sr-⁹⁰Y с активностью 0.1 МБк и мощностью дозы примерно 31.3 мкГр/ч. Продолжительность облучения растений составляла 15 сут. Максимальная накопленная доза составляла около 11.3 мГр. Оценку генетической регуляции проводили путем анализа экспрессии генов методом ПЦР “в реальном времени”. Для работы анализировали гены белков, которые потенциально могут обуславливать эффекты ИИ на ЭС. Разработка праймеров интересующих генов проводилась самостоятельно с соблюдением необходимых параметров. В качестве референсных генов использовали β -актин (*ACTB*) и гомолог белка слияния вакуолей (*MON1*). Полученные результаты анализировали по методике $\Delta\Delta Ct$.

Теоретический анализ потенциальных мишеней ИИ позволил выделить ключевые компоненты электрогенеза, воздействие на которые может объяснить модификацию ЭС. К ним относятся, в первую очередь, H⁺-АТФаза, NADPH-оксидаза и ионные каналы различных типов. По результатам ПЦР “в реальном времени” показано изменение экспрессии калиевых каналов. Проведенный анализ относительной экспрессии генов интереса позволяет определить вклад генетической регуляции в эффекты ИИ на стрессовый сигналинг.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки (проект № 075-15-2021-1068), а также при поддержке Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

РАЗНООБРАЗИЕ *LACTOBACILLUS* В МИКРОБИОТЕ КИШЕЧНИКА ПРИ ВЗК

Д. Р. Хуснутдинова^{1, 2, *}, М. И. Маркелова^{1, 2}, М. Н. Синягина¹, Е. А. Бульгина¹,
С. Р. Абдулхаков^{1, 3}, Т. В. Григорьева¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия

³Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

*E-mail: dilyahusn@gmail.com

Изменения в составе микробиоты кишечника, в том числе в происходящих в ней метаболических процессах, являются важными факторами в возникновении и прогрессировании воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Большой объем применения антибиотиков у взрослых может быть связан с повышенным риском ВЗК независимо от генетической предрасположенности. Прием пробиотиков на основе *Lactobacillus* может восстановить микробный гомеостаз в кишечнике, снизить воспаление и облегчить течение болезни. Однако, некоторые штаммы *Lactobacillus* способны негативно влиять на развитие заболевания, поэтому их

следует применять более осторожно в качестве пробиотиков во время активной фазы ВЗК. Цель данного исследования – оценить разнообразие *Lactobacillus* в составе микробиоты кишечника пациентов с ВЗК, а также пациентов после эрадикации *H. pylori* и здоровых добровольцев.

Для анализа использовали образцы кала: 42 – от здоровых людей, 40 – от пациентов с болезнью Крона (БК), 42 – от пациентов с язвенным колитом (ЯК) и 53 – после эрадикации *H. pylori*. Выделение ДНК проводили с использованием набора QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, USA). Метагеномное секвенирование проводили на приборе Nextseq 500 (Illumina, USA) согласно рекомендациям производителей, с последующим использованием программного пакета MetaPhlan2.

В результате метагеномного шотган-секвенирования у пациентов с ВЗК была обнаружена повышенная представленность рода *Lactobacillus* ($3.2 \pm 6.6\%$ – БК, p -value 0.006 и $1.6 \pm 2.8\%$ – ЯК, p -value 0.0005) в составе микробиоты кишечника по сравнению с контрольной здоровой группой ($0.3 \pm 1.2\%$). У пациентов после эрадикации *H. pylori* достоверного снижения доли *Lactobacillus* не обнаружено ($0.15 \pm 0.3\%$, $p > 0.05$). Для здоровых добровольцев характерно наличие 1–2 видов (29%), либо 3–5 видов (29%) лактобацилл в составе микробиоты кишечника, у 41% пациентов лактобациллы не обнаружены. Несмотря на тенденцию к снижению доли *Lactobacillus* в составе микробиоты кишечника у пациентов после эрадикации *H. pylori*, они отсутствовали только у 37% пациентов, что сопоставимо с контрольной группой. У оставшейся части пациентов после антибиотикотерапии обнаружено 1–2 (35%) и 3–5 видов (20%) *Lactobacillus*. Для большинства пациентов с БК и ЯК характерно наличие от 3 до 5 видов лактобацилл (38 и 31% соответственно). Для 23% пациентов с БК и 26% с ЯК характерно от 6 до 9 видов лактобацилл. Кроме того, у пациентов с ВЗК встречается более 10 различных видов лактобацилл в составе микробиоты кишечника: у 5% с БК и 7% с ЯК. Микробиота кишечника характеризуется повышенной представленностью нескольких видов лактобацилл по сравнению с контрольной группой: для пациентов с ВЗК – *L. salivarius*, *L. gasseri*, *L. mucosae*; для пациентов после эрадикации *H. pylori* – *L. fermentum*.

Состав микробиоты кишечника пациентов при ВЗК значительно отличается в отношении доли и состава лактобацилл. Вероятно, их увеличение может быть следствием попадания пробиотических видов из пищевых продуктов и активного роста на фоне иммуносупрессии.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

ENREST ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПОИСКА ОБОГАЩЕННЫХ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ДАННЫХ RNA-SEQ

А. В. Цуканов^{1,*}, В. Г. Левицкий¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: anton.v.tsukanov@yandex.ru

Современные транскриптомные технологии, такие как RNA-seq, обеспечивают высокую точность в обнаружении дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) как в разных типах клеток и тканях, так и в разных условиях обработки (Hrdlickova et al., 2017). Анализ данных RNA-seq позволяет выявлять множество ДЭГ или даже генных сетей, работа которых объясняет наблюдаемые биологические процессы. В настоящее время еще нет полного понимания механизмов регуляции экспрессии генов, но при этом известно, что ключевую роль в этой регуляции играют транскрипционные факторы (ТФ) (Lambert et al., 2018). ТФ связываются с ДНК в определенных участках, называемых сайтами связывания ТФ (ССТФ), тем самым оказывая влияние на уровень экспрессии гена (Lambert et al., 2018). Следовательно, идентификация ТФ, ответственных за наблюдаемые изменения в паттернах экспрессии генов, является важным шагом в понимании регулирования экспрессии генных сетей.

Для того чтобы определять, какими ССТФ обогащены 5'-регуляторные районы ДЭГ, мы разработали инструмент enRest (Tsukanov, 2021). В качестве входных данных используются результаты анализа эксперимента RNA-seq и список мотивов (позиционных частных матриц) из свободных баз данных, таких как NОСОМОСО, CIS-VP и JASPAR. Алгоритм выявления обогащенных ССТФ проходит в несколько этапов. В начале проводится сканирование всех промоторов для белок-кодирующих генов, которые определялись, как 2000 пар оснований от сайтов старта транскрипции. Далее промоторы разделяются на две группы: 1) тестовая и 2) ожидаемая. Тестовая группа состоит из промоторов ДЭГ, определенных по результатам анализа RNA-seq. По умолчанию применяются критерии ДЭГ: значимость с учетом множественных сравнений (*adjusted p-value* < 0.05), и изменение уровня экспрессии гена (*fold change* > 1.5). Ожидаемая группа включает такое же количество промоторов, но случайно выбранных из оставшихся генов генома, значение *adjusted p-value* > 0.05. Затем, чтобы оценить значимость обогащения для заданного мотива, применяется подход Монте-Карло. Для этого ожидаемая выборка генерируется множество раз, чтобы оценить распределение вероятно-

сти распознавания мотива для выборки заданного объема. Наконец, вычисляется значение *p-value* по обогащению для рассматриваемого мотива. Инструмент был протестирован на данных RNA-seq *H. sapiens* и *A. thaliana*. Наш новый инструмент позволяет эффективно идентифицировать обогащенные ССТФ на основе результатов экспериментов RNA-seq.

Работа поддержана государственным бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН № FWNR-2022-0006 и FWNR-2022-0020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hrdlickova R., Toloue M., Tian B.* 2017. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. WIREs RNA. V. 8. P. e1364.
Lambert S.A., Jolma A., Campitelli L.F., Das P.K., Yin Y., Albu M., Chen X., Taipale J., Hughes T.R., Weirauch M.T. 2018. The human transcription factors. Cell. V. 172. P. 650.
Tsukanov A. 2021. enREST, <https://github.com/ubercomrade/enrest>

ТАНДЕМНО ПОВТОРЯЮЩИЕСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В СОСТАВЕ ПОЛОВОЙ ХРОМОСОМЫ W У ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА

К. Н. Цуканова^{1,*}, М. М. Кулак¹, С. А. Галкина¹

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

*E-mail: tsukanovaksenia03@gmail.com

У организмов с хромосомным определением пола в кариотипах различают аутосомы и половые хромосомы. Аутосомы — хромосомы, одинаковые в мужских и женских организмах, а половые хромосомы — те, по которым отличаются мужские и женские особи. В зависимости от того, какой пол является гетерогаметным, выделяют системы половых хромосом XX/XY и ZW/ZZ. Несмотря на то, что система половых хромосом ZZ/ZW у птиц описана довольно давно, механизм детерминации пола остается неизвестным. Существуют две гипотезы: согласно первой, пол зависит от соотношения Z-хромосом и аутосом, согласно второй — специфичная для самок W-хромосома содержит доминантный ген, детерминирующий развитие яичников. Организация W-хромосомы наилучшим образом изучена у домашней курицы — показано, что в ее составе около 50 млн п.н., при этом всего 28 генов, тогда как ~40 млн п.н. занимают различные повторяющиеся последовательности (Bellott et al., 2017, Komissarov et al., 2018). Для остальных птиц точное строение W-хромосомы неизвестно, что затрудняет формулировку каких-либо обобщающих выводов о ее роли в регуляции половой дифференцировки.

Цель нашей работы — изучить строение гетерохроматиновой части W-хромосомы у японского перепела *Coturnix japonica* (Phasianidae, Galliformes). В ходе работы мы картировали известные тандемно повторяющиеся последовательности (ТП) на хромосоме W в фазе ламповых щеток (ЛЩ) методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и составили ее цитогенетическую карту. На пике стадии ЛЩ в составе W-хромосомы можно различить 17 хромомеров. Гетерохроматиновый блок из 8 хромомеров обогащен ТП CjarSAT и CJA-ApaI. CjarSAT занимает также прицентромерные DAPI-позитивные хромомеры. Другие ТП обнаружены в терминальных хромомерах Wqter и Wpter. Положение Cjar31B совпадает с BglII, оба ТП локализируются в районе центромеры, так же, как и в микрохромосомах. Только два хромомера, несущие небольшие латеральные петли оказываются не занятыми ТП. По-видимому, именно здесь должны располагаться W-сцепленные гены. Картированные ТП не являются W-специфичными, они обнаруживаются в составе и других хромосом, что подтверждается в том числе результатами FISH. В целом, W-специфические повторяющиеся последовательности сильно различаются между разными видами (Yamada et al., 2006). Выполняют ли картированные нами повторы перепела структурную или, возможно, регуляторную роль, пока остается непонятным. Однако детальные данные о составе W-хромосомы, несомненно, важны для выяснения ее роли в половой дифференцировке у птиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bellott D.W., Skaletsky H., Cho T.-J., Brown L., Locke D., Chen N., Galkina S., Pyntikova T., Koutseva N., Graves T., Kremitzki C., Warren W.C., Clark A.G., Gaginskaya E., Wilson R.K. et al.* 2017. Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. Nat. Genet. V. 49. P. 387.
Komissarov A.S., Galkina S.A., Koshel E.I., Kulak M.M., Dyomin A.G., O'Brien S.J., Gaginskaya E.R., Saifitdinova A.F. 2018. New high copy tandem repeat in the content of the chicken W chromosome. Chromosoma. V. 127. P. 73.
Yamada K., Nishida-Umehara C., Ishijima J., Murakami T., Shibusawa M., Tsuchiya K., Tsudzuki M., Matsuda Y. 2006. A novel family of repetitive DNA sequences amplified site-specifically on the W chromosomes in Neognathous birds. Chromosome Res. V. 14. P. 613.

СОЗДАНИЕ ПРОТОТИПА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЛОВУШКИ ДЛЯ ВИРУСА SARS-COV-2Д. А. Чантуридзе¹, А. В. Чистякова^{1,*}, Е. А. Смирнов¹, Д. Д. Андреева², Д. В. Королев², Ю. В. Чебуркин²¹Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет “ЛЭТИ” им. В.И. Ульянова, Санкт-Петербург, Россия²ФГБУ “НМИЦ им. В.А. Алмазова” Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: chistyakova.nastya.00@yandex.ru

Последние 20 лет в мире отмечался рост количества инфекционных заболеваний, связанных с появлением новых опасных патогенов. Особенно остро встал вопрос с появлением новых штаммов респираторных вирусов, распространение которых способно вызывать пандемии и приводить к серьезным социально-экономическим последствиям для целых континентов. Высокая изменчивость некоторых вирусов, приводящая к антигенному ускользанию от нейтрализующего воздействия иммунной системы организма или терапевтических антител, бросает вызов исследователям в области создания эффективных способов нейтрализации инфекционного агента, не чувствительных к его фенотипическим изменениям.

Проникновение SARS-CoV-2 внутрь клетки-хозяина опосредуется связыванием S-белка с экстрацеллюлярным доменом его ангиотензинпревращающего фермента-2 (ACE2). Трансмембранный рецептор ACE2 располагается на поверхности различных типов клеток и, в норме, конвертирует ангиотензин-II в ангиотензин(1–7). Будучи нетканеспецифичным, ACE2 широко представлен в тканях сердца, почек, кишечника, яичек, щитовидной железы и жировой ткани.

Используя данную биологическую тропность SARS-CoV-2 к рецептору ACE2, мы создали на основе SiO₂-наночастиц структуру, несущую на поверхности рекомбинантные белки-“ловушки”, способные распознавать инфекционный патоген и связывать его с функционализированными наночастицами.

Дальнейшим развитием проекта будет поиск возможных направленных мутационных модификаций рецептора, придающих ему повышенную аффинность к S-белку, что, таким образом, позволит получить конкурентное преимущество в образовании более прочной связи с патогеном, по сравнению с клетками-мишенями.

УЛУЧШЕНИЕ ПРЕДСКАЗАНИЙ ПРЕЗЕНТАЦИИ ПЕПТИДА НА МНС I КЛАССА ПРИ ПОМОЩИ ПРЕДОБУЧЕННЫХ ТРАНСФОРМЕРОВЕ. В. Шабурова^{1,2,*}, Д. В. Антонец^{1,2}¹ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Кольцово, Россия²ООО “Новые Программные Системы”, Новосибирск, Россия

*E-mail: shaburova.liz@yandex.ru

Благодаря увеличению количества открываемых перспективных вирусных антигенов и неоантигенов в последнее время все более актуальной становится разработка высокоспецифичных пептидных вакцин. Точное предсказание связывания и презентации пептидов на главном комплексе гистосовместимости (МНС) является важным аспектом на пути к реализации этой терапии. Идеальный инструмент для этой задачи должен быть панспецифичным, способным к обучению на разных источниках – как на основе данных об аффинности связывания лиганда с МНС, так и на основе данных об элюции лиганда, – а также быть интерпретируемым. Здесь мы представляем модель глубокого обучения на основе трансформеров, предварительно обученных на большом корпусе белковых последовательностей, натренированную для предсказания взаимодействия пептид-МНС I и сравниваем ее с текущими лидирующими в этой области моделями.

Для обучения и сравнения мы воспользовались открытыми наборами данных об аффинности связывания (VA) и масс-спектрометрии (EL), отражающих как события связывания, так и презентации соответственно. Модель получает в качестве входных данных аминокислотные последовательности пептида и псевдопоследовательность аллеля *MHC-I* и обрабатывает их параллельно с помощью предобученного трансформера BERT (мы взяли предобученную модель protBERT и дообучили ее с помощью наших собственных данных). После объединения эмбедингов и 2 полносвязных слоев, на выходе модель выдает предсказание сродства связывания и представления лиганда на МНС I класса. В качестве эталонных моделей были выбраны MHCNuggets и MHCFlurry 2.0. Чтобы сравнить модели на тестовом наборе данных, в качестве метрик мы выбрали долю правильных ответов (accuracy), полноту, точность, F-оценку, MCC (коэффициент корреляции Мэттьюса) и RocAUC.

В результате сравнения можно заключить, что предсказания нашей модели сравнимы с моделями MHCNuggets и MHCFlurry (MHCFlurry-BA, MHCFlurry-AP и MHCFlurry-PS). Кроме того, будучи обученной только на наборе данных EL, наша модель смогла превзойти другие модели, обученные на данных той же модальности (MHCNuggets и MHCFlurry-AP), что может свидетельствовать о способности архитектуры трансформера аккумулировать больше значимой информации и лучше обобщать.

Полученные в ходе работы результаты полезны для уточнения предсказания связывания и представления пептидов, что означает, что они в дальнейшем могут быть включены в процесс разработки вакцины, поскольку удовлетворяют всем предъявляемым требованиям. Дальнейшие исследования должны быть сосредоточены на способах включения данных об иммуногенности в обучающий набор данных и экспериментах с архитектурой модели. Более того, учитывая тот факт, что презентация эпитопов как класса I, так и II имеет решающее значение для индукции устойчивого эффективного иммунного ответа, необходимо исследовать возможность обучить одну и ту же модель для предсказания презентации пептидов MHC I и MHC II.

СОЗДАНИЕ УНИВЕРСАЛЬНОГО ВЕКТОРА ДОСТАВКИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ПУТЕМ МОДИФИКАЦИИ КАПСИДА АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ВТОРОГО СЕРОТИПА

Е. М. Шитик^{1,*}, И. К. Шалик¹, Д. В. Юдкин¹

¹ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

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

Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (рААВ) является ведущей платформой для доставки генотерапевтических препаратов *in vivo*. Данный вирус не является патогенным для клеток человека и обеспечивает длительную экспрессию трансгена, не встраивая свой генетический материал в геном хозяина. Несмотря на выраженные преимущества данного вируса, рААВ обладает широким неспецифическим тропизмом к разным клеткам-мишеням, что значительно ограничивает его применение в клинической практике. В рамках данной работы была проведена модификация капсида рААВ 2-го серотипа и была создана предварительная универсальная модель для создания высокотропных специфических векторов доставки.

Все изученные серотипы рААВ имеют схожую структуру капсида, состоящую из белков VP1, VP2 и VP3, закодированных в гене *Cap*. Ген *Cap* транскрибируется с одного промотора, в результате чего последовательность VP3 во всех белковых субъединицах повторяется. Именно последовательность VP3 определяет связывание рААВ 2-го серотипа с рецептором интереса — гепарансульфатом. Более того, последовательность VP3 белка определяет подверженность вируса процессам убиквитинирования в цитоплазме клеток-мишеней ввиду наличия гидроксильных групп определенных остатков тирозина. Субъединица VP2, представленная в небольшом количестве в структуре капсида, не оказывает значимого влияния на его сборку. При этом она имеет свободный N-конец, выступающий за пределы капсида, в область которого потенциально можно внести достаточно длинные последовательности аминокислот.

В рамках данной работы были получены три варианта модифицированных частиц рААВ 2-го серотипа, содержащих последовательность зеленого флуоресцентного белка EGFP. Трансдукция вирусных частиц выполнялась на линии клеток HeLa. Оценка эффективности трансдукции проводилась методом флуоресцентной микроскопии. Первый вариант содержал замены Y444F, Y500F и Y730F в последовательности белка VP3. Для данного варианта было показано повышение эффективности трансдукции более чем в 10 раз по сравнению с вирусом дикого типа. Второй вариант модифицированного вируса был получен с использованием генетических конструкций с вынесенной под отдельный промотор последовательностью VP2. В результате нами было показано, что данная модификация не влияет на сборку вирусных частиц. В случае третьего варианта вируса последовательность VP2 также была вынесена под отдельный промотор и были выполнены замены R585A, R588A, R484A, R487A, K532A и R513A в области VP3. Практически полное отсутствие флуоресценции по сравнению со вторым модифицированным типом показало, что эти замены определяют тропизм рААВ 2-го серотипа. Все указанные модификации были выполнены с использованием ПЦР с перекрывающимися праймерами, содержащими последовательности измененных кодонов.

Дальнейшее внесение белков интереса в область N-конца белка VP2 позволит оценить эффективность и универсальность полученного вектора.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Минобрнауки России (договор № 075-15-2019-1665).

МЕХАНИЗМЫ РЕОРГАНИЗАЦИИ ТОПОЛОГИИ ХРОМАТИНА В ЛОКУСЕ, СОДЕРЖАЩЕМ ГЕНЫ КЕРАТИНОВ I ТИПА, В ХОДЕ ЭПИДЕРМАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

А. С. Штомпель^{1,2}, М. К. Сидорова¹, О. С. Роговая³, А. Л. Риппа³, А. В. Лужин¹, С. В. Ульянов^{1,2},
С. В. Разин^{1,2}, Е. А. Воротеяк³, Е. П. Калабушева^{3,*}

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

³Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

*E-mail: kalabusheva.e@gmail.com

Набор экспрессируемых кератинов характеризует локализацию клетки в определенном органе и типе эпителиальной ткани, степень дифференцировки, нормальное или патологическое состояние окружающей ткани. В геноме кератины I и II типа локализованы в двух локусах на 12 и 17 хромосомах соответственно. Плотное расположение генов внутри локуса предполагает комплексную регуляцию экспрессии, как было ранее показано на кластерах глобиновых генов, НОХ-генов и др. Целью нашей работы была характеристика трехмерной организации локуса 12q13.13, содержащего кератины I типа и кератин 18 II типа, а также оценка изменений топологии при переключении экспрессии кератинов на модели эпидермальной дифференцировки.

В первую очередь охарактеризовали трехмерную организацию исследуемого локуса в дермальных фибробластах, не экспрессирующих кератины, и эпидермальных кератиноцитах на разных стадиях дифференцировки: кератин 5+ базальных кератиноцитов и кератин 1+ кератиноцитах шиповатого слоя. Значительная часть локуса была изолирована в петлевой домен, образованный двумя областями, одна из которых, LCR1 (locus control region, зона контроля локуса), находится на границе локуса, в то время как другая, LCR2, отделяет гены кератинов 8 и 18. В кератиноцитах промоторы активно экспрессируемых кератинов 1 и 5 формировали устойчивые контактные взаимодействия с LCR1 и LCR2. Повышенное содержание эпигенетических меток, ассоциированных с регуляторными элементами, и сайтов связывания архитектурных белков CTCF (по данным ENCODE) свидетельствуют о потенциальной энхансерной активности LCR1/2. Тепловая карта пространственных взаимодействий в локусе 12q13.13, построенная для индуцированных плюрипотентных клеток (ИПСК), характеризует организацию исследуемого участка в наименее дифференцированном состоянии и свидетельствует о практически полном отсутствии контактов между областями LCR1/2 и в целом релаксированном состоянии локуса в этих клетках. В иммортализованных кератиноцитах линии HaCaT мы наблюдали конденсацию локуса и при картировании топологии методом C-TALE, и при визуализации локуса методом FISH в сочетании с использованием STED-микроскопии. Линейные размеры локуса в линии HaCaT в 2 раза меньше, чем в ИПСК.

Для исследования характера контактных взаимодействий регуляторных элементов LCR друг с другом и промоторами генов кератинов обработали культуру базальных кератиноцитов 1,6-гександиолом, способным разрушать молекулярные конденсаты, формируемые за счет множественных транзитных взаимодействий неструктурированных доменов транскрипционных факторов. Анализ показал разрушение связей между промотором гена кератина 5 и LCR1/2, и ослабление, но не исчезновение, контакта, формируемого между областями LCR1/2. Таким образом, в формировании энхансер-промоторных взаимодействий в пределах локуса основную роль играет фазовое разделение, в то время как взаимодействие LCR1-LCR2 поддерживается главным образом за счет архитектурных белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-04-00778).

СЕКЦИЯ “ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ”**ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО КОЛХИЦИН-ПОДОБНОГО ИНГИБИТОРА ТУБУЛИНА**

М. Н. Анисимов^{1,2,*}, А. Н. Романов³, В. А. Митькевич⁴, Н. Б. Гудимчук^{1,2}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

³Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

⁴Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

*E-mail: amih199898@gmail.com

Особую роль среди элементов цитоскелета эукариотических клеток играют полимеры белка тубулина — микротрубочки, так как они участвуют во множестве процессов: внутриклеточном транспорте, обеспечении

подвижности клетки, а также ее делении. Благодаря уникальному свойству спонтанно переключаться между фазами полимеризации и деполимеризации (динамической нестабильности) микротрубочки способны распределять хромосомы по дочерним клеткам. Подавление динамической нестабильности ингибиторами тубулина приводит к остановке деления клетки и позволяет успешно использовать их в противоопухолевой терапии.

Одним из самых известных ингибиторов тубулина является колхицин. Несмотря на эффективное подавление пролиферации раковых клеток за счет блокирования митоза, это вещество не нашло широкого применения в терапии опухолей в основном по причине слишком высокой токсичности. Однако поиск других веществ, связывающихся с внутримерным сайтом тубулина, подобно колхицину, представляет большой интерес. Нами предпринята попытка найти новые колхицин-подобные ингибиторы тубулина в соответствии с двумя критериями: 1) аналогичное колхицину воздействие на параметры динамической нестабильности микротрубочек; 2) подобное колхицину воздействие на культуры раковых клеток человека. Последний критерий позволил отобрать потенциальные колхицин-подобные вещества в базе данных Национального Института Рака США с помощью алгоритма кластеризации COMPARE, сравнивая профили их цитотоксичности по отношению к клеткам разных линий рака человека с профилем цитотоксичности колхицина. Выбрано вещество кумарин-30, воздействие которого на динамическую нестабильность микротрубочек нами впервые исследовано в экспериментах *in vitro* с помощью DIC микроскопии. Оказалось, что так же, как и колхицин, кумарин-30 оказывает сильный концентрационно-зависимый эффект на скорость полимеризации плюс-концов микротрубочек при субстехиометрических концентрациях. Чтобы определить механизм воздействия кумарина-30 на динамику микротрубочек, нами впервые установлен сайт связывания этого вещества со свободным димером тубулина с использованием метода микротермофореза. Оказалось, что в присутствии колхицина происходит конкуренция за внутримерный сайт связывания, в то время как с другими известными ингибиторами тубулина неколхицинового ряда (винбластин, эрибулин, гризеофульвин) кумарин-30 не конкурирует.

Таким образом, нами экспериментально верифицированы предсказания кластеризационного алгоритма поиска новых ингибиторов тубулина на примере вещества кумарин-30, оказавшегося подобным колхицину.

Поиск веществ выполнен при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-74-20035). Анисимов М.Н. является стипендиатом Фонда развития теоретической физики и математики “БАЗИС”, поддержавшего изучение динамики микротрубочек. Исследование с помощью микротермофореза выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета “Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина”.

КОМПЛЕКС ФАКТОРА RbFA С 30S СУБЪЕДИНИЦЕЙ РИБОСОМЫ *S. AUREUS*

А. Г. Бикмуллин^{1, *}, А. Стеценко⁴, Б. Ф. Фатхуллин², А. А. Голубев¹, Ш. З. Валидов¹, А. В. Рогачев⁴,
А. И. Гуськов⁴, М. М. Юсупов³, К. С. Усачев¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Институт белка РАН, Пущино, Россия

³Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC), Страсбург, Франция

⁴Университет Гронингена, Гронинген, Нидерланды

*E-mail: aydar.bikmullin@gmail.com

Функция рибосомы лежит в основе центральной догмы молекулярной биологии. Созревание рибосомы является сложным клеточным процессом РНК-белковых взаимодействий и модификаций. Исследование механизмов созревания рибосомы позволит выявить мишени для управления или полного блокирования биосинтеза белка в клетке. Это особенно актуально в борьбе с патогенными бактериями в условиях постоянного роста их устойчивости к антибиотикам. Одним из таких патогенов является золотистый стафилококк *S. aureus* с множественной антибиотикорезистентностью (MRSA).

Созревание большой и малой субъединиц рибосомы происходит при участии специальных белковых факторов, регулирующих данный процесс. Один из таких факторов созревания — фактор RbfA из *S. aureus*. Это небольшой РНК-связывающий белок размером ~14 кДа, который локализуется на малой 30S субъединице в районе декодирующего центра на поздних стадиях ее созревания. Фактор связывается с 3'-концом 16S рРНК и способствует структурному переходу спирали h28 из незрелого состояния в зрелое.

Выделение и очистка белка RbfA и 30S субъединиц, сборка комплекса, приготовление образцов для криоэлектронной микроскопии проводились согласно протоколам, разработанных нами ранее (Bikmullin et al., 2020; Belinite et al., 2021). Сбор данных проводили на криоэлектронном микроскопе Talos Arctica, детектор Falcon 2 (Thermo Fisher/FEI Company, США).

В результате обработки данных с помощью инструментов программного обеспечения RELION и PHENIX была получена карта электронного потенциала с общим разрешением $\sim 3.5 \text{ \AA}$ (FSC = 0.143). Было обнаружено, что RbfA связывается с 30S субъединицей в районе декодирующего центра, а именно в пространстве между 3'-концом и спиралью h28 и h44-h45 16S рРНК. Консервативный КН-домен (hkh-мотив) фактора RbfA, состоящий из двух α -спиралей, расположенных под углом $\sim 120^\circ$, взаимодействует с 3'-концом 16S рРНК. Полученные нами данные согласуются с аналогичными результатами в гомологичном белке RbfA из *E. coli* (Schedlbauer et al., 2021).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-54-15001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bikmullin A.G., Nurullina L.I., Garaeva N.S., Klochkova E.A., Blokhin D.S., Golubev A.A., Validov S.Z., Khusainov I.S., Usachev K.S., Yusupov M.M. 2020. *In vitro* reconstitution of the *S. aureus* 30S ribosomal subunit and RbfA factor complex for structural studies. *Biochemistry (Mosc)*. V. 85. № 5. P. 545.

Belinite M., Khusainov I., Soufari H., Marzi S., Romby P., Yusupov M., Hashem Y. 2021. Stabilization of ribosomal RNA of the small subunit by spermidine in *Staphylococcus aureus*. *Front. Mol. Biosci*. V. 8: 738752.

Schedlbauer A., Iturrioz I., Ochoa-Lizarralde B., Diercks T., López-Alonso J.P., Lavin J.L., Kaminishi T., Çapuni R., Dhimole N., de Astigarraga E., Gil-Cardon D., Fucini P., Connell S.R. 2021. A conserved rRNA switch is central to decoding site maturation on the small ribosomal subunit. *Sci. Adv*. V. 7: eabf7547.

ВЛИЯНИЕ ДИЕТЫ С ВИТАМИНАМИ ГРУППЫ В НА ОКСИДАТИВНЫЙ СТАТУС КРЫС С ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ МИГРЕНИ С АУРОЙ

К. С. Богатова^{1,*}, О. В. Яковлева¹

¹Казанский федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: kowarik.ru@yandex.ru

Мигрень – неврологическое заболевание, характеризующееся многофазными приступами головной боли (Dodick, 2018). Одной из причин возникновения мигрени считается повышенный уровень гомоцистеина (Гц) в организме и связанные с ним дисфункция эндотелия сосудов и окислительный стресс (Gerasimova et al., 2021, 2022). Имеются данные, указывающие на то, что развитие ассоциированных с Гц сосудистых заболеваний и окислительного стресса можно предотвратить путем поддержания нормального уровня Гц с помощью фолиевой кислоты, витаминов В₆ и В₁₂ (Depeint et al., 2006; Яковлева и др., 2019; Gerasimova et al., 2021). Целью работы было проанализировать оксидативный статус в мозге крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией (ГГц), с ГГц и введении витаминов В₆, В₉, В₁₂ после моделирования хронической мигрени.

Было сформировано 4 группы самцов крыс линии Wistar в возрасте 5–7 мес.: 1) контрольная группа (К) ($n = 8$); 2) ГГц – крысы, рожденные от самок на метиониновой диете ($n = 7$); 3) К + витамины (К + В) – контрольные крысы, получавшие витамины группы В ($n = 6$); 4) группа ГГц + В – крысы с ГГц, получавшие витамины группы В ($n = 8$). Мигрень с аурой моделировали повторной аппликацией 1 М КСI на твердую мозговую оболочку (5 аппликаций через день). С помощью классических биохимических методов анализировали содержание малонового альдегида (МДА) и активность глутатион пероксидазы (ГП) в тканях мозга после окончания эксперимента.

Было выявлено увеличение концентрации МДА в группе ГГц (4.2 ± 0.3 мкг/г ткани) относительно группы К (3.5 ± 0.2 мкг/г). Предварительное введение витаминов снижало окислительный стресс в группе ГГц + В (3.4 ± 0.4 мкг/г). Активность ГП снижалась в группе ГГц (148.7 ± 50.9 мкг/г ткани в мин) относительно группы К (276.7 ± 61.4 мкг/г в мин), а введение витаминов восстанавливало активность данного фермента (372.5 ± 57.8 мкг/г в мин). Таким образом, пренатальная ГГц вызывает окислительный стресс, а введение витаминов группы В способствует улучшению антиоксидантной защиты организма.

Работа выполнена в рамках гос. задания № 0671-2020-0059 и гранта РФФИ № 20-15-00100.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Яковлева О.В., Зиганшина А.Р., Герасимова Е.В., Арсланова И.З., Ярмиев И.З., Зефирова А.Л., Ситдикова Г.Ф. 2019. Влияние витаминов группы В на раннее развитие крысят с пренатальной гипергомоцистеинемией. *Рос. физиол. ж. им. И.М. Сеченова*. Т. 105. № 10. С. 1247.

Depeint F., Bruce W.R., Shangari N., Mehta R., O'Brien P.J. 2006. Mitochondrial function and toxicity: role of B vitamins on the one-carbon transfer pathways. *Chem. Biol. Interact*. V. 163. P. 113.

Dodick D.W. 2018. Migraine. *Lancet (London, England)*. V. 391. P. 1315.

Gerasimova E., Burkhanova G., Chernova K. 2021. Hyperhomocysteinemia increases susceptibility to cortical spreading depression associated with photophobia, mechanical allodynia, and anxiety in rats. *Behav. Brain. Res.* V. 409. P. 113324.

Gerasimova E., Yakovleva O., Enikeev D., Bogatova K., Hermann A., Giniatullin R., Sitdikova G. 2022. Hyperhomocysteinemia Increases Cortical Excitability and Aggravates Mechanical Hyperalgesia and Anxiety in a Nitroglycerine-Induced Migraine Model in Rats. *Biomolecules.* 12(5): 735.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА (IR)

А. А. Гавриленкова^{1,2,*}, И. Е. Деев¹, Е. А. Ганцова¹, Э. В. Бочаров¹, О. В. Серова¹

¹Институт биоорганической химии им. академ. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

*E-mail: alycat1008@gmail.com

Рецептор инсулина принадлежит семейству рецепторных тирозинкиназ (RTKs), которые играют ключевую роль в развитии и дифференцировке клеток. RTKs состоят из 3-х частей: внеклеточной части, которая отвечает за связь с лигандом, трансмембранного домена (ТМ), и внутриклеточной части, участвующей в фосфорилировании субстратов. На данный момент проводится много исследований по изучению механизмов активации и передачи внутриклеточного сигнала семейства рецепторов инсулина, но точные механизмы конформационных изменений рецепторов при их активации до сих пор неизвестны. Предполагается, что в неактивном состоянии ТМ-домены рецептора инсулина находятся в конформации, препятствующей взаимодействию цитоплазматических частей молекулы. При связывании лиганда конформация рецептора меняется, в результате чего внутриклеточные тирозинкиназные домены сближаются и фосфорилируют друг друга, вызывая клеточный ответ.

Для того, чтобы изучить роль трансмембранного домена в активации рецептора IR, мы получили мутантные формы рецептора, содержащие двойные замены в трансмембранном домене. Клетки линии НЕК293 трансфицировали плазмидными конструкциями, кодирующими мутантные формы IR с заменами I971E–F972R; F976E–S977R; I980E–G981R. Затем клетки инкубировали в среде F-12 с добавлением 400 нМ инсулина, клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота с антителами к фосфорилированной и тотальной форме рецептора. В результате эксперимента мы получили следующие данные. Мутации F976E–S977R; I980E–G981R не влияли на характер активации рецептора. Двойная замена I971E–F972R приводила к фосфорилированию рецептора в отсутствие лиганда в отличие от рецептора дикого типа, который фосфорилируется только в присутствии инсулина. Мы предполагаем, что двойная замена I971E–F972R приводит к стабилизации димера рецептора в активной конформации за счет образования солевых мостиков между аргинином и глутаминовой кислотой в трансмембранном домене и, как следствие, к автофосфорилированию внутриклеточных частей рецептора в отсутствие лиганда. Далее мы провели анализ влияния одиночных замен I951E и F952R на автофосфорилирование рецептора. Одиночные мутации I951E и F952R также приводили к активации рецептора в отсутствие лиганда. Нами было установлено, что автофосфорилирование рецептора IR как с двойной заменой I951E–F952R, так и с одинарными заменами I951E и F952R в отсутствие инсулина приводит к активации внутриклеточных сигнальных белков IRS-1 и ERK. Это свидетельствует о том, что данные замены в трансмембранном домене IR, вероятно, приводят к образованию функционально-активного димера рецептора в отсутствие лиганда.

Исходя из полученных данных, мы можем сделать вывод о том, что трансмембранный домен играет важную роль в активации IR, и даже точечные замены в его аминокислотной последовательности могут приводить к изменению характера активации рецептора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (проект № 20-04-00880).

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛУТАМАТ-ОПОСРЕДОВАННЫХ ТОКОВ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА КРЫС С ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ

Э. Д. Гатаулина^{1,*}, А. В. Яковлев¹, Г. Ф. Ситдикова¹

¹Казанский федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: maileen2013@yandex.ru

Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, образующаяся из метионина, является фактором риска развития целого ряда патологий. Повышение уровня гомоцистеина во время беременности (пренатальная гипергомоцистеинемия, ГГц) приводит к различным осложнениям беременности и, как следствие, разви-

тию ранних и отсроченных постнатальных патологий. Одним из механизмов нейротоксического действия гомоцистеина является активация ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в клетках, стимуляция которых приводит к развитию гипервозбудимости нейронов. Целью исследования был анализ спонтанных НМДА и АМПА-опосредованных токов в пирамидных нейронах гиппокампа крыс с пренатальной ГГц.

Эксперименты проводили на горизонтальных срезах гиппокампа новорожденных крысят на первой неделе постнатального развития. Для создания модели пренатальной ГГц использовалась пищевая метиониновая нагрузка (7.7 г/кг корма) в течение всей беременности самок крыс. Спонтанные возбуждающие постсинаптические токи пирамидных нейронов СА3 области гиппокампа регистрировали в режиме “целая клетка” с фиксацией потенциала для АМПА-рецепторов на -70 мВ и для НМДА-рецепторов на $+50$ мВ в присутствии селективных ингибиторов ГАМК-рецепторов.

Анализ спонтанных возбуждающих постсинаптических токов, вызванных активацией АМПА-рецепторов (спВПСП-АМПА) показал увеличение как амплитуды, так и частоты спВПСП-АМПА в нейронах крыс с пренатальной ГГц по сравнению с контрольной группой. В контроле средняя амплитуда спВПСП-АМПА составила 9 ± 2 пА ($n = 21$), а в группе ГГц – 15 ± 2 пА ($n = 25$, $p > 0.05$) относительно контроля. Также наблюдалось усиление частоты спВПСП-АМПА у крыс с пренатальной ГГц до 0.2 ± 0.04 ($n = 25$, $p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой – 0.1 ± 0.03 Гц ($n = 21$). Анализ распределения амплитуд спВПСП-АМПА показал увеличение количества высокоамплитудных событий в срезах крыс с пренатальной ГГц. В следующей серии экспериментов был проведен анализ спонтанных возбуждающих постсинаптических токов, вызванных активацией НМДА-рецепторов (спВПСП-НМДА). В нейронах гиппокампа крыс с пренатальной ГГц наблюдалось достоверное увеличение частоты спВПСП-НМДА. Так, средняя частота спВПСП-НМДА в контрольной группе была 1.2 ± 0.1 Гц ($n = 47$), а в нейроне гиппокампа крыс с пренатальной ГГц – 1.7 ± 0.2 Гц ($n = 29$; $p < 0.05$). Амплитудно-временные параметры спВПСП-НМДА в контроле и в группе крыс с пренатальной ГГц достоверно не изменялись. Так, амплитуда и время спада спВПСП-НМДА в контроле составляли 17 ± 1 пА и 39 ± 4 мс ($n = 47$) соответственно, а в экспериментальной группе – 15 ± 1 пА и 32 ± 2 мс ($n = 29$; $p > 0.05$) соответственно, относительно контроля.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что в условиях хронического действия высоких концентрации гомоцистеина происходит изменение свойств как АМПА-, так и НМДА-рецепторов.

Работа выполнена в рамках программы “Приоритет-2030” и при финансовой поддержке РФФ (проект № 20-15-00100).

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ О НЕЙРОННОЙ АКТИВНОСТИ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ MINISCOPE

Е. И. Герасимов^{1,*}, Е. И. Пчицкая¹, А. В. Митенев¹, П. И. Васильев¹, А. И. Ерофеев¹, В. С. Чуканов¹,
О. Л. Власова¹, И. Б. Безпрозванный^{1,2}

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

²Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, Даллас, Техас, США

*E-mail: evgeniigerasimov1997@gmail.com

Визуализация активности нейронов *in vivo* является актуальной задачей в современной нейробиологии. Информация об изменениях в нейронных связях при нейродегенеративных заболеваниях *in vivo*, вероятно, могла бы показать функциональные нарушения на их ранних стадиях. Современным подходом, который позволил получить данные о нейронной активности *in vivo* в нефиксированном животном, стал Miniscope. Miniscope дает исследователям возможность регистрировать нейронную активность в свободнодвижущемся животном, что позволяет детектировать параметры нейронной активации областей мозга с их последующим анализом (Gerasimov et al., 2020). Для реализации многокомпонентного анализа нами был разработан программный пакет, выполненный на Python, для оценки метрик высокого уровня, основанных на обработанных данных. Это позволяет вычислять различные статистические данные активации нейронов: количество активаций нейрона за промежутки времени, количество активных клеток за промежутки времени, максимальное количество одновременно активных клеток во временном интервале и средние корреляции.

Для решения проблемы анализа полученных данных возможно применение метода высокоуровневого анализа, представленного в данной работе. В текущем исследовании инъекция вируса GCaMP6 была выполнена в гиппокамп (AP -2.1 , ML $+2.1$, DV -1.8) 5-месячных мышей FVB, и через 3 нед. над интересующей областью

фиксируют градиентную линзу. Изменения уровня кальция регистрировались с помощью Miniscope v2 в домашней клетке мыши.

Определение активного состояния нейрона выполняется на основе производных входных сигналов после их предварительной обработки, которая осуществляется при помощи программного продукта Minian. Для этого на основе статистических данных вычисляется пороговое значение. Считается, что нейрон находится в активном состоянии, если производная его сигнала превышает пороговое значение. Благодаря такому подходу, на настоящем этапе, были вычислены не только статистики, описывающие количественное значение активности нейронной сети, но и корреляции попарно-активных нейронов. Обработанные данные позволили сделать вывод, что строгой зависимости значения коэффициента корреляции между нейронами и расстоянием нет.

Таким образом, разработанный инструмент обеспечивает возможность высокоуровневой обработки нейронных данных, полученных с помощью Miniscope. В наших будущих исследованиях эти количественные показатели найдут применение при сравнении активности нейронной сети гиппокампа у мышей дикого типа и мышинных моделей болезни Альцгеймера в поведенческих тестах.

Работа была поддержана программой стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Российской Федерации (Соглашение 75-15-2021-1333 от 30.09.2021 с СПбПУ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Gerasimov E.I., Erofeev A.I., Pushkareva S.A., Barinov D.S., Bolsunovskaja M.V., Yang X., Yang H., Zhou C., Vlasova O.L., Li W., Bezprozvanny I.B. 2020. Miniature fluorescent microscope: history, application, and data processing. *Zh. Vyssh. Nerv. Deyat. im I.P. Pavlova*. V. 70. № 6. P. 852.

КАК УЗНАТЬ, КАКИЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ ЭКСПРЕССИРОВАНЫ В НЕЙРОНАХ?

А. М. Гиглаев¹, А. И. Кузьменков¹, В. М. Табакмахер¹, С. Пеньёр², Э. Л. Пиньейро-Жуниор², Ш. Рагураман³, Б. Оливера³, Я. Титгат², А. А. Василевский^{1, *}

¹*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

²*Лёвенский университет, Лёвен, Бельгия*

³*Университет Юты, Солт-Лейк-Сити, США*

**E-mail: avas@ibch.ru*

Ионные каналы определяют способность нейронов отвечать на стимулы и генерировать спайки, а также задают доступный диапазон частот спайков. Поэтому знание того, какие именно ионные каналы экспрессированы в тех или иных нейронах, имеет принципиальное значение для нейробиологии. В докладе я постараюсь описать используемые исследователями подходы, указав на их преимущества и недостатки. Особый сложный случай представляют гетеромерные каналы. Информация о том, гены каких субъединиц экспрессированы в нейронах, не дает ответа на вопрос о субъединичном составе зрелых гетеромерных каналов. Использование в этом случае специфичных антител тоже не лучшее решение, поскольку необходимо не только детектировать субъединицы, но и определить их число и взаимное расположение.

Удобным инструментом для детекции ионных каналов и определения их субъединичного состава служат нейротоксины. Я приведу примеры токсинов, вошедших в практику нейробиологических исследований, и остановлюсь на наших последних разработках, связанных с получением лигандов, селективных в отношении гетеромерных калиевых каналов. К примеру, нейроны часто экспрессируют гены изоформ потенциал-чувствительных калиевых каналов Kv1.1 и 1.2, которые могут образовывать шесть различных зрелых тетрамеров мембранных альфа-субъединиц. Тест-системой для направленного поиска селективных лигандов этих тетрамеров служат мономерные “конкатемерные” каналы, у которых субъединицы сшиты в одну длинную полипептидную цепь – таким образом удается точно контролировать их число и взаимное расположение. Нами показана функциональная полноценность конкатемерных конструкций и их фармакологическая эквивалентность природным тетрамерным каналам. Затем мы использовали два подхода: (1) провели поиск селективных соединений среди природного многообразия нейротоксинов и (2) выполнили рациональное конструирование на их основе новых лигандов с улучшенными свойствами. В результате нам удалось получить соединения, которые могут различать субъединичный состав гомомерных и гетеромерных калиевых каналов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-44-01015).

МЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ В ЯИЧНИКАХ *D. MELANOGASTER* ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ НЕВЕСОМОСТИ

М. А. Голубкова^{1, *}, И. В. Огнева¹

¹Государственный научный центр РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: ma_golubkova@mail.ru

Взаимодействие клетки с полем силы тяжести Земли происходит при непосредственном участии цитоскелета, перестройки которого можно наблюдать в условиях невесомости. Установлено, что данные изменения структуры цитоскелета, по-видимому, могут происходить в результате изменения экспрессии генов.

Регуляция экспрессии генов у *D. melanogaster* происходит главным образом при помощи посттрансляционных модификаций гистонов, в частности посредством ацетилирования и метилирования гистонов.

В данной работе мы определяли относительное содержание метилированных форм гистона H3, а также содержание белков, участвующих в формировании цитоскелета, в яичниках *D. melanogaster*, полный цикл гаметогенеза которых проходил в условиях воспроизведения эффектов невесомости. Эффекты невесомости создавали при помощи машины случайного позиционирования.

Результаты определения относительного содержания цитоскелетных белков свидетельствуют о том, что в группе, экспозиция которой проходила в условиях симулированной невесомости, на фоне отсутствия изменений содержания альфа- и бета-тубулина, содержание альфа-тубулина было снижено на 35% по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$). При этом относительное содержание маркера стабильных микротрубочек – ацетилированного альфа-тубулина – в условиях симулированной невесомости увеличилось на 93% ($p < 0.05$) относительно контрольных значений. Содержание бета-актина в группе симулированной невесомости также было увеличено по сравнению с контролем на 27% ($p < 0.05$). Изменений содержания актин-связывающего белка – альфа-актинина обнаружено не было.

Результаты определения относительного содержания метилированной формы гистона H3 показали, что в группе, экспозиция которой проходила в условиях симулированной невесомости, содержание гистона H3, три-метилированного по Lys9, увеличилось по сравнению с контролем на 21% ($p < 0.05$).

Полученные результаты позволяют предположить, что наблюдаемое изменение метилирования гистона H3 в яичниках *D. melanogaster*, полный цикл гаметогенеза которых проходил при воспроизведении эффектов невесомости, может быть значимо для регуляции экспрессии генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН 65.4.

СРАВНЕНИЕ ДВУХ УБИКВИТИН-ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ ДОМЕНОВ БЕЛКА S5A В ОЧИСТКЕ 26S-ПРОТЕАСОМ С ПОМОЩЬЮ УБИКВИТИН-ПОДОБНОГО ДОМЕНА БЕЛКА HR23A

А. А. Еврейская^{1, 2, *}, А. В. Кузнецов^{1, 3}, А. С. Цимоха¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: evreiskaia@scamt-itmo.ru

Убиквитин-протеасомная система (УПС) – один из основных инструментов деградации белков в клетке. Центральным протеолитическим компонентом УПС является 26S-протеасома, которая состоит из 20S-коревой частицы и 19S-регулятора. 20S-протеасома содержит каталитические субъединицы $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$ и осуществляет гидролиз субстрата, в то время как 19S-регулятор узнает и связывает помеченный убиквитином субстрат, отщепляя молекулы убиквитина и проталкивая субстрат внутрь протеолитической камеры 20S-протеасомы. Участие УПС во множестве клеточных процессов, а также наличие большого числа патологий человека, сопряженных с нарушением в работе УПС, поддерживает актуальность исследований функционирования УПС в клетке, а следовательно, делает необходимым разработку методов для выделения и очистки 26S-протеасом.

Разработанный на основе убиквитин-подобного домена (UBL) белка HR23A и убиквитин-связывающего домена (UIM) белка S5a метод очистки 26S-протеасом лежит в основе дорогостоящих коммерческих наборов. Для отработки этого метода в лабораторных условиях мы создали три экспрессионных вектора на основе pGEX-5X-1 и pET-28a (+). Первый содержал UBL, слитый с GST на N-конце, GST-UBL. Вторая и третья конструкции содержат слитый с последовательностью из шести гистидинов (6xHis) второй UIM домен, His-

UIM2, и два домена UIM, His-UIM1-2. Метод очистки протеасом разработан на основе одного UIM2 домена белка S5a, но согласно литературным данным у белка S5a, включающего в себя два UIM домена, наблюдается повышенное сродство к UBL домену HR23A.

Кроме того, использование UIM1-2 кажется нам более эффективным в очистке протеасом за счет большей мол. массы белка His-UIM1-2 (14 кДа) по сравнению с His-UIM2 (7 кДа), поскольку не требует усовершенствованных электрофоретических систем разделения белка для визуализации белков с молекулярной массой меньше 10 кДа.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 19-29-04117).

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ПРОЦЕССОВ СБОРКИ И РАЗБОРКИ ТУБУЛИНОВЫХ МИКРОТРУБОЧЕК МЕТОДОМ БРОУНОВСКОЙ ДИНАМИКИ

И. А. Ельцов^{1, 2, *}, У. В. Ульянов², Д. С. Виноградов³, Н. Б. Гудимчук^{2, 3}

¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

*E-mail: eltsov.ia@phystech.edu

Микротрубочки – это динамические полимеры тубулина, которые выполняют множество важных функций на протяжении всего жизненного цикла эукариотической клетки. Микротрубочки проявляют способность резко удлиняться и укорачиваться на несколько микрометров. Этот процесс очень чувствителен к температуре: микротрубочки полимеризуются при температурах выше комнатной и деполимеризуются при температуре ниже 20°C (при физиологической концентрации тубулина).

Воздействие температуры на стабильность микротрубочек изучено недостаточно, однако ее влияние используется как способ быстрого определения стабильности микротрубочек посредством охлаждения клеток. Недавно наша лаборатория разработала вычислительную модель, описывающую динамику микротрубочек, используя комбинированный подход броуновской динамики и Монте-Карло. Эта модель предоставила точные описания структур концов микротрубочек во время сборки и разборки, а также позволила по-новому взглянуть на механизмы создания толкающих и тянущих сил микротрубочками при динамике. В настоящей работе мы расширяем нашу модель, чтобы описать чувствительность сборки и разборки микротрубочек к температуре.

Температура играет сложную роль в поведении молекул. Рассматривая общую задачу перехода частиц через энергетический барьер, можно учесть влияние температуры на вероятность присоединения тубулина к концу микротрубочки. Используя полученную аналитическую зависимость при моделировании сборки микротрубочки можно избежать необходимости учитывать все молекулы тубулина, плавающих в растворе, сконцентрировавшись на описании взаимодействия мономеров внутри микротрубочки. Эти взаимодействия в рамках нашей модели представлены тремя типами энергетических функций: латеральный потенциал, потенциал лонгитудальной связи между тубулинами и потенциал изгиба. Предложенный нами метод позволяет учитывать поведение молекул тубулина в зависимости от температуры вне микротрубочки (неявно), а также температурную зависимость динамики тубулинов внутри решетки микротрубочки (явно).

Совокупно, наш анализ дает оценку активационных барьеров между тубулинами и проливает новый свет на старую проблему термостабильности тубулинового цитоскелета.

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА СЛИЯНИЕ МОДЕЛЬНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

П. Д. Злодеева^{1, *}, Е. В. Шекунов¹, С. С. Ефимова¹, О. С. Остроумова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: zlodееva.pd@yandex.ru

Вирусы являются возбудителями серьезных заболеваний живых организмов. Они способны вызывать как сезонные эпидемии, так и мировые пандемии. Большинство существующих противовирусных препаратов обладают значимыми недостатками, такими как возникновение резистентности вирусов к лекарственным средствам (вследствие мутации и реассортации) и ограниченность в применении. В связи с этим необходимы исследования для разработки препаратов, воздействующих на консервативную часть вируса – липидную мембрану.

Работа посвящена поиску природных экстрактов, характеризующихся антифузогенными свойствами в отношении слияния отрицательно заряженных малых липидных везикул, и выявлению молекулярных механизмов ингибирующего действия (ИД) тестируемых соединений.

Методом измерения утечки флуоресцентного маркера, кальцеина, показано, что при кальций-индуцированном слиянии липосом, сформированных из фосфатидилглицерина, фосфатидилхолина и холестерина (ФГ/ФХ/ХОЛ) (40/40/20 мол. %), ИД обладали экстракты листьев облепихи (ЭЛО) и чаги (ЭЧ). Для выявления механизма действия ЭЛО был проведен анализ ИД флавонолов (мирицетина, кверцетина, рутина), входящих в его состав. Результаты флуориметрии свидетельствуют о наличии антифузогенной активности мирицетина и кверцетина. Полученные результаты согласуются с результатами дифференциальной сканирующей калориметрии, согласно которым флавонолы вызывают падение T_m (максимальной температуры основного фазового перехода) и повышение $T_{1/2}$ (ширины основного пика на полувысоте). Это указывает на разупорядочивающее действие флавонолов. Также отсутствие пика, соответствующего предпереходу на термограмме плавления дипальмитоилфосфохолина (ДФПХ), говорит об образовании положительной спонтанной кривизны на фоне активности мирицетина и кверцетина. Методом флуориметрии показано, что присутствие тетрациклических тритерпеноидов (бетулина и люпеола), являющихся компонентами ЭЧ, не определяет ИД экстракта. Предположительно инотодиол, компонент ЭЧ, способен инициировать образование положительной кривизны мембраны благодаря наличию гидроксильной группы в его боковой цепи. Индукция положительной кривизны при адсорбции инотодиола может объяснять антифузогенную активность ЭЧ.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ № 22-15-00417.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ЭНДОГЕННЫХ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ НЕК293

Д. О. Колесников^{1,*}, А. В. Перевозникова¹, К. О. Гусев¹, Л. Н. Глушанкова¹, Е. В. Казначеева¹, А. В. Шалыгин¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: koledmi3@mail.ru

Ионы кальция регулируют множество процессов в живых организмах. Одним из основных источников кальция в электро-невозбудимых клетках является депо-управляемый вход. Поступление ионов кальция через депо-управляемые каналы может регулировать активность кальций-зависимых хлорных каналов (CaCC).

Мы описали в клетках НЕК293 эндогенные каналы CaCC, которые характеризовались следующими свойствами. Во-первых, выходящим выпрямлением на положительных потенциалах, умеренной селективностью к хлорид-ионам. Во-вторых, каналы могли быть активированы только ионами кальция, но не бария, при этом активация каналов ионами кальция происходила с задержкой. В-третьих, добавление во внутриклеточный раствор кальциевых хелаторов EGTA и ВАРТА приводило к уменьшению активности эндогенных каналов CaCC, а добавление селективного ингибитора каналов CaCC CaCC_{inh} АО1 приводило к уменьшению как вероятности, так и времени открытого состояния каналов. Описанные нами свойства в совокупности характерны для каналов CaCC, сформированных белками ANO6.

Анализ активности эндогенных каналов CaCC на уровне одиночных каналов позволил выявить механизмы увеличения тока через каналы CaCC при деполяризации мембраны и изучить механизмы подавления их активности селективными ингибиторами и кальциевыми хелаторами. Было показано, что при росте потенциала на мембране увеличивается как проводимость, так и вероятность открытого состояния каналов CaCC. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция также приводило к росту вероятности открытого состояния каналов CaCC. В свою очередь, добавление кальциевого хелатора ВАРТА и селективного ингибитора CaCC_{inh} АО1 приводило к уменьшению времени открытого состояния каналов CaCC.

Во второй части работы мы изучили регуляцию каналов CaCC депо-управляемым входом кальция. Нами было показано сопряжение активаций эндогенных каналов CaCC и депо-управляемых каналов в клетках НЕК293. Используя кальциевые хелаторы ВАРТА и EGTA, мы доказали, что эти каналы расположены в одном кальциевом микродомене и расстояние между каналами не превышает 20 нм.

Полученные нами сведения о свойствах эндогенных каналов CaCC позволяют выявить механизмы увеличения и уменьшения тока через каналы CaCC и расширить наше понимание о регуляции кальций-зависимых хлорных каналов депо-управляемым входом кальция.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-24-00761).

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Л. В. Крылова^{1,*}, Н. Н. Пескова¹, А. Б. Воловецкий², В. Ф. Отвагин¹, Н. С. Кузьмина¹,
А. В. Нючев¹, А. Ю. Федоров¹, И. В. Балалаева¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

*E-mail: lu.krylova@mail.ru

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является активно развивающимся методом лечения онкологических заболеваний. Для повышения эффективности ФДТ при лечении солидных опухолей ведется разработка фотосенсибилизаторов (ФС) с комбинированным действием. Данная концепция заключается в объединении ФС с агентами для таргетной терапии для получения наибольшего терапевтического эффекта (аддитивного или синергического) и преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Также с целью повышения селективности накопления ФС в опухолевой ткани производят дополнительную конъюгацию с биологически активными молекулами, в частности с углеводами.

Целью данной работы явилось исследование свойств фотосенсибилизаторов нового поколения для фотодинамической терапии онкологических заболеваний.

На первом этапе работы были исследованы фотофизические и биологические свойства гликоконъюгатов хлорина *еб* с моносахаридами – галактозой и глюкозой; или дисахаридом – мальтозой. На основании полученных данных был отобран наиболее перспективный гликоконъюгат с мальтозой, обладающий наиболее оптимальными свойствами для ФС.

На втором этапе исследовали конъюгат цинкового комплекса хлорина *еб* с мальтозой и вандетанибом (ZnChl–Vd). Вандетаниб представляет собой ингибитор тирозинкиназной активности рецепторов ростовых факторов EGFR и VEGFR. В ходе исследования показано, что ZnChl–Vd обладает интенсивным поглощением и флуоресценцией в красной области спектра. Квантовый выход флуоресценции не превышает 6%, а квантовый выход синглетного кислорода составил около 20%. Эксперименты *in vitro* проводили на культурах клеток эпидермоидной карциномы человека A-431 (EGFR+) и клеток яичника китайского хомячка CHO (EGFR-, VEGFR-). Методом конфокальной микроскопии установлено интенсивное накопление ZnChl–Vd в клетках A-431 с локализацией в лизосомах, везикулах и аппарате Гольджи. Показан выраженный цитотоксический эффект ZnChl–Vd в отношении A-431. Эксперименты *in vivo* продемонстрировали высокую селективность накопления конъюгата в опухоли, а также показали его противоопухолевую активность за счет комбинированного воздействия.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности исследуемого соединения и позволяют рассматривать его в качестве потенциального агента с комбинированным действием для лечения онкологических заболеваний.

Работа осуществлена в Научно-исследовательской лаборатории химии природных соединений и их синтетических аналогов, созданной в рамках Государственного задания при НОЦ “Техноплатформа-2035” (FSWR-2021-014) при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-73-10230), а также при поддержке Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

АЛЛОИДНЫЕ QDS НА ОСНОВЕ CDXZN1-XSEYS1-Y/ZNS И ИХ НАНОКОМПОЗИТЫ С SPIONS В КЛЕТКАХ

И. К. Литвинов^{1,*}, А. А. Матюшкина², А. О. Орлова², Е. С. Корнилова^{1,3,4}, Т. Н. Беляева¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

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

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: lik314@mail.ru

Благодаря своим уникальным фотофизическим свойствам полупроводниковые квантовые точки (QDs) находят широкое применение в биологии и биомедицинской диагностике. Наночастицы оксида железа (Fe₃O₄ или γ-Fe₂O₃), обладающие суперпарамагнитными свойствами (SPIONs), являются перспективными элементами для терапии, в частности – магнитной гипертермии. Магнитолюминесцентные композиты на основе QDs и SPIONs могут служить платформой, сочетающей визуализацию и терапию.

QDs на основе CdSe/ZnS с ядром диаметром 6 нм и максимумом люминесценции при 570 нм, были синтезированы на базе университета ИТМО. Исходно гидрофобные QDs были солюбилизованы с помощью покрытия их поверхности L-цистеином методом межфазного переноса. Наноконпозиты QD–SPIONs, были образованы за счет формирования координационной связи между молекулами L-цистеина и атомами железа на их поверхностях.

В ходе работы было изучено поступление в клетки как QD–SPIONs, так и их отдельных компонентов (QDs и SPIONs). Согласно данным конфокальной микроскопии, через 24 ч инкубации с клетками HeLa и A549 значительная часть QDs формирует большие агрегаты, в основном локализующиеся на поверхностной мембране клеток. В то же время была обнаружена внутриклеточная локализация QDs в везикулярных эндолизосомоподобных структурах. Идентификация QDs-содержащих компартментов была произведена путем анализа колокализации с маркерами основных компартментов эндоцитозного пути (EEA1, LysoTracker, Lamp1). Показано, что SPIONs, визуализация которых проводилась с помощью окрашивания по Перлсу, предназначенного для идентификации соединений железа, также способны проникать в клетки. Наноконпозиты QD–SPIONs, как и в случае одиночных QDs и SPIONs, обнаруживались как внутри клеток, так и на их поверхности. Внутриклеточные конпозиты ассоциировались с относительно небольшими везикулярными структурами, при этом диффузного окрашивания цитоплазмы или ядра не наблюдалось даже после 24 ч инкубации. На поверхности клеточных мембран конпозиты также выявлялись в виде крупных скоплений. Следует отметить, что колокализация наноконпозитов с маркерами пути лизосомной деградации в закисленных эндолизосомах была ниже, чем в случае QDs.

Важно подчеркнуть, что благодаря спектрально-люминесцентным свойствам QDs наноконпозиты прекрасно визуализируются в клетках даже при низких наномолярных концентрациях, что позволяет минимизировать риски цитотоксичности. В то же время анализ кинетики затухания фотолуминесценции QDs–SPIONs, ассоциированных с клетками, дает информацию о влиянии микроокружения и агрегатном статусе.

Таким образом мы показали, что наноконпозиты QD–SPIONs могут использоваться как стабильные и визуализируемые платформы для тераностики.

РОЛЬ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ РАЗЛИЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ АКТИН-УПРАВЛЯЕМЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ ЛЕЙКЕМИИ ЧЕЛОВЕКА K562

Д. В. Лыскова^{1, 2, *}, В. Ю. Васильева¹, В. И. Чубинский-Надеждин¹, А. В. Сударикова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: darya25198@gmail.com

Ионные каналы участвуют в регуляции множества физиологических и патофизиологических функций в клетках и тканях организма. Известно, что миграционная и пролиферативная способность опухолевых клеток зависит от изменения клеточного объема и мембранного потенциала, что в свою очередь зачастую связано с работой различных типов ионных каналов. Потенциал-независимые натрий-селективные каналы являются одним из основных путей входа натрия, определяющих быстрые изменения натриевой проницаемости в трансформированных клетках крови. Особое внимание уделяется патофизиологической роли эпителиальных натриевых каналов ENaC (epithelial Na⁺ channels), чувствительных к приложению внеклеточных агентов. Ранее в клетках миелоидной лейкемии человека K562 были обнаружены амилорид-нечувствительные каналы ENaC, которые были названы актин-управляемыми из-за их регуляторного механизма, связанного с динамикой примембранного актина. Также был выявлен внеклеточный механизм регуляции каналов активатором классических ENaC протеазой трипсином. Цель настоящей работы – исследование действия сериновых протеаз различной специфичности на активность актин-управляемых натриевых каналов, а также изучение влияния протеаз и их ингибиторов на миграционную, инвазивную и пролиферативную способность клеток K562. В экспериментах whole-cell методом patch-clamp была обнаружена активация одиночных натриевых каналов при внеклеточном приложении сериновых протеаз различной специфичности: трипсина (5 мкг/мл), α-химотрипсина (5 мкг/мл) и плазмина (10 мкг/мл). Каналы активировались через 2–3 мин после добавления протеаз и не блокировалась аналогом амилорида бензамилом (50 мкМ). Полученные функциональные характеристики протеолитически-активируемых каналов совпадали с характеристиками каналов ENaC и актин-управляемыми натриевыми каналами в клетках K562. Добавление во внеклеточный раствор трипсина или α-химотрипсина, предварительно инкубированных с ингибитором трипсина из плодов сои SBTI (1 : 10 или 1 : 40 соответственно), или плазмина в присутствии его ингибитора α₂-антиплазмина (в соотношении 1 : 4) не приводило к активации натриевых токов, что указывает на участие протеолитической активности ферментов в активации каналов. Прямое, а не опосредованное, действие сериновых протеаз на натриевые каналы подтверждено в опытах cell-attached. Также было обнаружено, что

инкубация клеток лейкемии K562 с протеазами и их ингибиторами, изменяет миграционную, инвазивную и пролиферативную способность клеток. Таким образом, различные сериновые протеазы могут использоваться как универсальные внеклеточные модуляторы активности актин-управляемых натриевых каналов в трансформированных клетках крови, а также могут рассматриваться как потенциальные регуляторы миграционной способности и клеточного роста.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-015-00211).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНЫХ СВОЙСТВ НОВОГО ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРОТИВОРАКОВОГО СОЕДИНЕНИЯ SMTB39

Л. О. Макарова^{1, 2, *}, А. В. Коршунова³

¹Московский физико-технический институт Национальный исследовательский университет, Москва, Россия

²Московский государственный университет, Москва, Россия

³Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: makarova.lo@phystech.edu

Тубулин – высококонсервативный белок эукариот, из $\alpha\beta$ -димеров которого состоят протофиламентные микротрубочки, обладающие свойством динамической нестабильности (стохастическое переключение между фазами полимеризации и деполимеризации). Микротрубочки являются частью цитоскелета клетки, а также играют ключевую роль в сегрегации хромосом. Многие малые молекулы, влияющие на динамику микротрубочек (паклитаксел, винкристин и др.) являются широко применяемыми и эффективными противораковыми препаратами. Однако, они также обладают значительной токсичностью. Поиск новых более тонких регуляторов динамики микротрубочек является актуальной научной и медицинской задачей. При *in vitro* скрининге веществ из базы NCI (National Cancer Institute, США) и последующей экспериментальной проверке методом флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF) нами было обнаружено вещество под кодовым названием SMTB39, влияющее на динамику микротрубочек. В тестах *in vivo* вещество вызывало полную остановку роста культуры почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Целью исследования было изучение возможного механизма действия SMTB39. В результате работы было установлено, что помимо изменения динамики микротрубочек, SMTB39 оказывает влияние на взаимодействие микротрубочки с МАРами (Microtubules Associated Protein). В присутствии 200 мкМ SMTB39 увеличивается количество белка EB1, присоединившегося к микротрубочкам, по сравнению с контролем. Эти результаты позволяют предположить, что вещество связывается на микротрубочке и изменяет сайт посадки белка EB1, повышая его аффинность. Кроме того, в экспериментах с динамическими микротрубочками выявлено, что вместе вещество SMTB39 и белок EB1 оказывают значительное стабилизирующее действие и приводит к тому, что микротрубочки только растут, не переходя к стадии катастрофы. Открытым остается вопрос, этот ли механизм вызывает остановку роста клеток дрожжей. Для выяснения причин остановки роста выявлена минимальная ингибирующая концентрация SMTB39 (15 мкМ). Установлено, что SMTB39 для дрожжей является цитолитиком и его действие необратимо. Также оказалось, что клетки *S. cerevisiae* способны достаточно быстро вырабатывать устойчивость к SMTB39, однако полученные мутантные линии дрожжей, устойчивые к SMTB39, отличались снижением скорости роста по сравнению с диким типом в присутствии и без вещества SMTB39. В дальнейшем планируется провести полногеномное секвенирование полученных мутантных линий и проанализировать, какие мутации привели к выработке иммунитета к веществу и образовались ли замены генах *Vim1p* (гомолог EB1 в дрожжах) и генах тубулина. Таким образом, нами впервые описано вещество, влияющее на динамику микротрубочек и при этом усиливающее связывание с МАР белком. На основе полученных результатов выдвинута гипотеза о том, что SMTB39 дестабилизирует цитоскелет клетки за счет влияния на микротрубочки и белки, взаимодействующие с ними.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-74-20035).

ВЛИЯНИЕ ХРОМОНИЛАЛЛИЛМОРФОЛИНОВ НА ИОННЫЙ ТРАНСПОРТ ЧЕРЕЗ МОДЕЛЬНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

В. А. Мартынюк^{1, *}, А. А. Захарова¹, С. С. Ефимова¹, И. П. Яковлев², Н. М. Чернов², О. С. Остроумова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: Ve08ra@mail.ru

Многочисленные исследования демонстрируют влияние производных морфолина на работу ферментов и рецепторов, преимущественно ассоциированных с мембранами клеток центральной нервной системы, таких как ацетилхолинэстераза и NMDA-рецепторы.

Целью данной работы являлось исследование влияния хромонилаллилморфолинов (ХМ) на физико-химические свойства модельных липидных мембран и встроенных в них ион-проводящих каналов. Были проведены электрофизиологические и флуориметрические измерения изменений граничного потенциала (ϕ_b) липидных бислоев и дипольной компоненты (ϕ_d) граничного потенциала мембран, включающих пальмитолеилфосфохолина (ПОФХ), диолеилфосфолипид и Кдо2 (2-кето-3-деоксиоктановая кислота) – липид А. Следует отметить, что фосфохолин широко распространен в мембранах клеток млекопитающих, а фосфолипид А характерны для внутренней и наружной мембран грамотрицательных бактерий. Кроме того, было охарактеризовано влияние производных морфолина на проводимость одиночных каналов, сформированных грамицидином А (Гра) и макроскопический ток, индуцированный полимиксином Б (ПМБ).

Обнаружено, что среди протестированных соединений наибольшей мембраномодифицирующей способностью обладает хлорид 1-[1-(4-оксо-6-хлор-4Н-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолина. Максимальное снижение ϕ_b липидных бислоев из ПОФХ, вызванное введением в мембраноомывающий 0.1 М раствор KCl (рН 7.4) этого производного, составляет 120 ± 20 мВ. Включение в липидную систему отрицательно заряженных компонентов, приводит к падению изменения ϕ_b почти в 2 раза в присутствии указанного соединения. Также, оно вызывает значительное снижение ϕ_d ПОФХ – мембран. Расчет доли молекул в заряженной форме показал, что при физиологических условиях ионизировано лишь около 10%. Исходя из полученных данных, выдвинуто предположение о том, что модуляция ϕ_b вызвана преимущественно встраиванием в мембрану незаряженной формы протестированного ХМ.

Результаты исследований порообразующей активности Гра в ПОФХ показали, что введение хлорид 1-[1-(4-оксо-6-хлор-4Н-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолина до концентрации 250 μ М приводит к росту проводимости одиночных Гра-каналов примерно на 16%, что можно объяснить снижением величины энергетического барьера для проникающего катиона вследствие вызванного соединением снижения ϕ_d . В свою очередь, падение ϕ_b мембран, включающих фосфолипид А и Кдо2-липид А, в присутствии указанного соединения вызывает 5-кратное увеличение ПМБ-индуцированного тока, вероятно, из-за потенциации встраивания в липидный бислой положительно заряженных молекул липопептида. На основании полученных результатов можно предположить, что падение электрического потенциала на границе вода-мембрана, индуцированное изученным производным ХМ, может влиять на свойства ионных каналов, встроенных в мембраны клеток млекопитающих и бактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-15-00417).

ВНУТРИЯДЕРНЫЕ ТЕЛЬЦА В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ ЗЕБРОВОЙ АМАДИНЫ: МОРФОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВ

К. С. Матвеева^{1,*}, Е. А. Кондакова¹, С. А. Галкина¹

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

*E-mail: ksum.miha@gmail.com

Организация и молекулярный состав внутриядерных структур в растущих ооцитах у птиц были в разной степени исследованы на таких объектах, как зяблик (*Fringilla coelebs*), голубь (*Columba livia*), курица (*Gallus g. domesticus*) и японский перепел (*Coturnix japonica*). Среди них только у голубя обнаружены тельца, подобные тельцам Кахалы (Khodyuchenko et al., 2012). Канонические тельца Кахалы (ТК) – внутриядерные органеллы соматических и половых клеток высших эукариот, которые участвуют в сборке малых ядерных и ядрышковых рибонуклеопротеинов (мяРНП и мякРНП), включая мяРНП сплайсосом, играя роль в созревании РНК. Важным компонентом ТК является белок коилин, ключевой функцией которого является сборка и поддержание целостности ТК. Долгое время коилин считался маркером ТК, однако на сегодняшний день известно о его наличии и в других внутриядерных органеллах.

Зебровая амадина *Taeniopygia guttata* (Estrildidae, Passeriformes) служит важным модельным объектом нейробиологии и сравнительной геномики, и в настоящее время является наиболее изученным представителем певчих воробьиных птиц. Используя методы иммунохимического анализа и флуоресцентной гибридизации *in situ*, мы показали особенности организации и состава внутриядерных телец растущих ооцитов у амадины.

Мы обнаружили, что в ооцитах амадины все обнаруживаемые внутриядерные тельца являются коилин-положительными, содержат РНК, в разной степени накапливают фактор сплайсинга SC35 и Sm-белки сплайсосомных мяРНП. В некоторых тельцах выявляются нуклеолин и фибрилларин – белки ядрышка, наличие которых обнаружено и в ТК млекопитающих (Trinkle-Mulcahy, Sleeman, 2017). В тельцах не выявля-

ются белки когезинового комплекса (Rad21, SMC1, SMC3, STAG2), топоизомераза IIa, характерные для центромерных белковых тел ооцитов птиц, и малая ядрышковая РНК U3.

Показано изменение количества, размера и внешнего вида коилиновых телец по мере завершения стадии хромосом-ламповых щеток и их конденсации, а также закономерный характер ассоциации этих телец с определенными хромосомами. В частности, коилиновые тельца меньшего размера выявляются в ассоциации с хромосомой клеток половой линии (Germline-Restricted Chromosome, GRC), а именно с гетерохроматиновыми “поясками” — маркером данной хромосомы. Анализ гистологических срезов яичника амадины, окрашенных гематоксилин-эозином, позволил предположить взаимосвязь между ядрышком и внутриядерными тельцами. По всей видимости, исследуемые нами внутриядерные тельца необходимы для запасания и/или распределения различных ядрышковых и сплайсосомных белков. Утверждать, что они выполняют функции ТК, пока оснований нет.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-04-00967а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Khodyuchenko T., Gaginskaya E., Krasikova A. 2012. Non-canonical Cajal bodies form in the nucleus of late stage avian oocytes lacking functional nucleolus. *Histochem. Cell Biol.* V. 138. P. 57.

Trinkle-Mulcahy L., Sleeman J.E. 2017. The Cajal body and the nucleolus: “In a relationship” or “It’s complicated”? *RNA Biol.* V. 14. P. 739.

ВОЗНИКНОВЕНИЕ, ЭВОЛЮЦИЯ И РАЗНООБРАЗИЕ ИОННЫХ КАНАЛОВ СУПЕРСЕМЕЙСТВА P-LOOP: КАК МЫ ВИДИМ ЭТО СЕГОДНЯ

И. А. Поздняков*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

**E-mail: pozdnyakov@incras.ru*

P-loop-каналы — суперсемейство катионных каналов, представители которого характеризуются наличием консервативного структурного мотива так называемой поровой петли, или P-loop. Среди наиболее известных представителей этого суперсемейства — потенциал-управляемые калиевые, натриевые и кальциевые каналы. Порообразующие субъединицы таких каналов всегда представлены (псевдо)тетрамерами, в которых формирование собственно поры канала происходит за счет сближения четырех P-loop-мотивов. По-видимому, первые P-loop-каналы возникли на самых ранних этапах эволюции клетки, еще до появления так называемого последнего универсального общего предка (LUCA) и довольно быстро дали структурное и функциональное разнообразие родственных белков. На сегодняшний день может быть насчитано около 20 известных эволюционных линий P-loop-каналов. Эволюция этих белков шла разнообразными путями: дубликациями и внутригенными дубликациями, межгенными слияниями и тасовкой доменов, крупными делециями и др. Мы считаем, что основным событием в эволюции всего суперсемейства стало слияние анцестрального порового домена с так называемым потенциал-чувствительным доменом (VSD), что позволило этим каналам управляться изменениями мембранного потенциала. Важнейшим же событием в эволюции VSD-каналов стало изменение в структуре селективного фильтра: замена “жесткой бочки” карбониллов на “гибкое кольцо” боковых радикалов аминокислотных остатков. Мы считаем, что именно это событие привело к систематическому возникновению $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -селективности среди P-loop-каналов и, как следствие, на системном уровне к возникновению электровозбудимости у эукариот. Эволюционные отношения между большинством из 20 линий каналов не разрешены. Причин этому две. Во-первых, белки, составляющие комплексы ионных каналов, низко консервативны по первичной последовательности. Так, идентичность последовательностей из разных подгрупп внутри одной эволюционной линии P-loop-каналов редко превышает 30%. Мы считаем, что решению этой проблемы могло бы отчасти способствовать развитие методов молекулярного моделирования и 3D-выравнивания, поскольку фолд этих белков относительно консервативен. Во-вторых, основные молекулярные и структурные данные о каналах получены на очень ограниченном круге объектов. Решению этой проблемы способствует вовлечение в поле исследований данных, полученных на нестандартных организмах. Такими организмами, например, являются одноклеточные эукариоты, составляющие основное разнообразие всех эукариот. В этом докладе будут представлены наши последние результаты, полученные с помощью методов эволюционной и структурной биоинформатики, которые демонстрируют значение ионных каналов этих организмов не только для нашего понимания эволюции и разнообразия P-loop-каналов, но и для понимания такого базового свойства канала, как селективность.

ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НОСИТЕЛИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Е. Д. Путевич^{1, 4, *}, Л. А.-А. Гараева^{1, 3, 4}, Е. В. Ястремский³, Р. А. Камышинский³, С. Б. Ланда¹, А. С. Спицына¹, С. С. Емельянова^{1, 2}, А. Л. Коневега^{1, 3, 4}, Т. А. Штам^{1, 2, 3}

¹НИИ “Курчатовский институт” – ПИЯФ, Гатчина, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³НИИ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁴Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: lena.put23@gmail.com

Экстраклеточные везикулы (ЭВ) представляют собой наноразмерные частицы, окруженные билипидным слоем, которые способны переносить белки, липиды и нуклеиновые кислоты без деградации, благодаря чему, в последнее время, ЭВ рассматриваются как перспективные системы доставки лекарственных веществ (ЛВ).

Одним из перспективных источников ЭВ являются растения, так как, в отличие от хорошо изученных на сегодняшний день экзосом, выделенных из биологических жидкостей человека, растительные везикулы (РЭВ) возможно получать в производственных масштабах.

Целью данной работы является поиск среди РЭВ, полученных из различных продуцентов, наиболее перспективного доставщика ЛВ.

В ходе работы РЭВ были выделены методом ультрацентрифугирования из сока мезокарпия грейпфрута (*Citrus paradisi*), ирги (*Amelanchier ovalis*), калины (*Viburnum opulus*), томата (*Solanum lycopersicum*), огурца (*Cucumis sativus*), дыни (*Cucumis melo*); луковицы чеснока (*Allium sativum*) и культуральной среды одноклеточных водорослей: хламидомонады (*Chlamidomonas reinhardtii*) и хлореллы (*Chlorella vulgaris*). После чего РЭВ были охарактеризованы по размеру, концентрации, форме, морфологии и дзета-потенциалу. Для оценки эффективности загрузки и доставки экзогенного белка при помощи РЭВ к клеткам человека, везикулы были нагружены флуоресцентно меченым белком HSP70-Alexa647 методом соинкубации и обработки ультразвуком.

Полученные растительные везикулы имели преимущественно сферическую форму, окруженную билипидным слоем. Также при оценке морфологии РЭВ методом Стю-ЕМ были получены единичные частицы овальной и яйцевидной формы, везикулы с повышенной электронной плотностью, мультивезикулярные мешки и везикулы, имеющие несколько билипидных слоев. Размер частиц лежал в диапазоне от 20 до 200 нм.

Эффективность загрузки РЭВ белком HSP70-Alexa647 была оценена методом флуориметрии. Исследование показало, что наиболее эффективно белок был нагружен в РЭВ хламидомонады, хлореллы и чеснока. Стоит отметить, что эффективность загрузки РЭВ не превышает 4% от первичного количества соинкубируемого белка (0.1 мг/мл).

Оценка эффективности доставки экзогенного белка клеткам человека *in vitro* производилась методом проточной цитометрии. Было показано, что наиболее эффективно экзогенный белок к клеткам человека доставляют РЭВ хламидомонады, хлореллы и ирги.

При анализе двух параметров, удельного количества получаемых частиц и эффективности доставки экзогенного белка к клеткам человека при помощи РЭВ, было отмечено, что такие продуценты, как хламидомонада, калина и грейпфрут, являются наиболее перспективными для экстракции РЭВ при разработке фармакологических наносистем доставки ЛВ на основе растительных везикул.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-201).

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НАКОПЛЕНИЯ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ОРГАНЕЛЛАХ КЛЕТОК ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

И. И. Рамазанова^{1, *}, Г. В. Сибгатуллина¹, С. В. Федоренко², Д. В. Самигуллин¹

¹Казанский научный центр Российской академии наук, Казань, Россия

²Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН, Казань, Россия

*E-mail: iliza.ramazanova@mail.ru

Магнитные наночастицы (МНЧ) в последнее время начали активно применяться в биомедицине. Их используют в качестве флуоресцентных биологических меток, для адресной доставки лекарственных препаратов, а также в качестве посредников для влияния на внутриклеточную сигнализацию. В связи с этим изучение накопления МНЧ внутри клеток и их аккумуляция в определенных клеточных органеллах в настоящее

время является актуальной задачей. В данной работе были проведены исследования колокализации новых МНЧ, модифицированных аминокислотами, с органеллами (митохондриями (М), лизосомами (Л), ядрами (Я)) мотонейронов (МН) и раковых клеток М-HeLa. Оценку колокализации проводили для трех промежутков времени (3, 6, 24 ч после загрузки МНЧ) и 24 ч после их выгрузки.

В исследовании использовали МНЧ, синтезированные в ИОФХ им. А.Е. Арбузова. НЧ покрыты оболочкой из диоксида кремния с добавлением флуоресцентных комплексов рутения, модификация аминокислотами обеспечивает лучшую интернализацию в клетки. Первичная культура МН была получена из спинного мозга новорожденных крысят Вистар, клетки М-HeLa – из коллекции клеточных культур института цитологии РАН. Посадка осуществлялась путем внесения необходимого количества суспензии клеток на обработанное поли-L-лизинном покровное стекло, с дальнейшим внесением питательной среды DMEM. Загрузку клеток МНЧ (20 мкг/мл) осуществляли на третьи сутки после посева в течение 3, 6, 24 ч. Также оценивали выгрузку МНЧ: после 24 ч инкубации, раствор с МНЧ удаляли, клетки промывали раствором DPBS и инкубировали в среде без МНЧ еще 24 ч. Для изучения колокализации МНЧ с М использовали краситель MitoTracker Green (50 нмоль), с Л – LysoTracker Blue DND-22 (50 нмоль), с Я – DAPI (1 мкг/мл). Анализ проводили с помощью конфокального лазерного микроскопа Leica TCS SP5. Степень колокализации оценивали при помощи коэффициента корреляции Пирсона (r^p).

При инкубации МН с МНЧ, покрытых аминокислотами, в течение 3 ч процент клеток с интернализированными в них МНЧ составил 97%, 6 ч – 98%, 24 ч – 100%, спустя 6 ч после отмывки – 100%. r^p для МНЧ и М клеток М-HeLa после 24 ч инкубации составил 0.44 ± 0.012 , с Л – 0.41 ± 0.079 . r^p для МНЧ и М МН после инкубации в течение 3 ч – 0.18 ± 0.009 , 6 ч – 0.36 ± 0.02 , 24 ч – 0.48 ± 0.017 , через 24 ч после изъятия раствора с МНЧ – 0.21 ± 0.015 . r^p МНЧ с Л МН через 3 ч инкубации – 0.17 ± 0.012 , 6 ч – 0.20 ± 0.019 , 24 ч – 0.22 ± 0.015 , после 24 ч выгрузки – 0.21 ± 0.012 . МНЧ в Я клеток МН после 3, 6, 24 ч загрузки обнаружены не были.

Таким образом, для всех исследуемых вариантов $r^p < 0.5$, что свидетельствует о слабой степени колокализации МНЧ с М и Л, как для МН, так и для М-HeLa. При этом было выявлено, что колокализация МНЧ с М и Л возрастает при увеличении времени инкубации МН с МНЧ. После 24 ч разгрузки степень колокализации МНЧ с М и Л снижается. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что МНЧ способны активнее проникать в М, чем в Л, тогда как в Я не проникают совсем.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-25-00731).

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА НАТРИЕВОЙ СОЛИ ПРИ ЕЕ ОБРАБОТКЕ ИМПУЛЬСНЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ В ОТНОШЕНИИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Н. А. Роденко^{1,2,*}, Т. И. Васильева², И. А. Беляева^{1,2}, А. В. Богданов³, В. А. Глушеников^{1,2}

¹Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Самара, Россия

²Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Самара, Россия

³Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

*E-mail: t.rodenco@mail.ru

Взаимодействие веществ с магнитным полем является предметом многолетнего интереса исследователей. В литературе описан факт изменения биологической активности некоторых лекарственных препаратов после воздействия на них магнитным полем (Kakikawa et al., 2019). Степень изменения зависела от параметров магнитного поля. Представляет интерес исследование влияния импульсного магнитного поля (ИМП) на бензилпенициллина натриевую соль при параметрах магнитного поля, используемых в технике (Прокофьев и др., 2019).

Данный лекарственный препарат выбран исходя из широкого применения в ветеринарии для лечения мастита, отита, заболеваний мочеполовой системы и др. В эксперименте использовали аптечный препарат бензилпенициллина натриевой соли в сухом виде. Обработку антибиотика осуществляли при напряженностях магнитного поля $H = (0.09 \times 10^6 \text{ А/м} - 1.23 \times 10^6 \text{ А/м})$ при частоте $f = 40 \text{ кГц}$ и количестве импульсов $n = 1$.

Для определения чувствительности бактерии к лекарственному препарату применяли стандартный диск-диффузионный метод со стерильными разведениями. Антибактериальная активность оценивали размером среднего диаметра зоны лизиса в мм. Диаметр зон задержки роста измеряли с точностью до 0.5 мм.

В результате проведенных исследований по воздействию ИМП на антибиотик было показано достоверное увеличение диаметров зон подавления роста грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* по сравнению с контролем на 12–24%. В отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* изменение анти-

бактериальной активности антибиотика под воздействием ИМП с такими же параметрами не обнаружено. Однако исследование порошкообразного аптечного препарата бензилпенициллина натриевой соли после обработки ИМП в отношении грамположительных бактерий *Micrococcus luteus* при тех же параметрах обработки способствовала увеличению биологической активности при напряженностях $H = 0.09 \times 10^6$ А/м и $H = 0.50 \times 10^6$ А/м на 11 и 13% соответственно.

Для выявления механизма полученных изменений осуществлен анализ бензилпенициллина натриевой соли после воздействия ИМП с помощью методов УФ-спектроскопии и ЯМР-спектроскопии. Исследования позволяют сделать предварительный вывод, что под воздействием ИМП молекула лекарственного препарата переходит в возбужденное состояние. В условиях дополнительного энергетического влияния магнитного поля изменяется энергетика молекулы антибиотика. Это неизбежно усиливает эффективность антибактериального действия. При этом изменений в структуре молекулы лекарственного препарата не происходит.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Прокофьев А.Б., Беляева И.А., Глушников В.А., Карпунин В.Ф., Черников Д.Г., Юсупов Р.Ю. 2019. Магнитно-импульсная обработка материалов. М-во науки и высш. образования Рос. Федерации, Самар. Федер. исслед. центр Рос. акад. наук (САНЦ РАН). Самара: Изд-во СНЦ.

Kakikawa M., Maeda T., Yamada S. 2019. Combined effect of 60 Hz magnetic fields and anticancer drugs on human hepatoma HepG2 cells. IEEE J. Electromagn. RF Microw. Med. Biol. V. 3. P. 56.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ Ca^{2+} -АКТИВИРУЕМЫХ K^+ -КАНАЛОВ БОЛЬШОЙ ПРОВОДИМОСТИ: РЕГУЛЯЦИЯ ЭНДОГЕННЫМИ МЕТАБОЛИТАМИ И ВЛИЯНИЕ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ

Г. Ф. Ситдикова*

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: Guzel.Sitdikova@kpfu.ru

Ионные каналы играют ключевую роль в функционировании всех живых клеток, как животных, так и растений. Представители семейства калиевых каналов отвечают не только за поддержание мембранного потенциала покоя и реполяризацию мембраны во время потенциала действия, но также контролируют пролиферацию клеток, освобождение гормонов и медиаторов, состояние гладкомышечных клеток сосудов и желудочно-кишечного тракта и другие процессы. Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы образуют подгруппу каналов, которым для активации необходимо повышение уровня Ca^{2+} внутри клетки или комбинация повышения Ca^{2+} и изменения потенциала мембраны. Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы большой проводимости (ВК-каналы или KCa1.1, Slo1, Maxi-K, *KCNMA1*) являются продуктом экспрессии одного гена и характеризуются самой высокой среди других типов калиевых каналов проводимостью одиночного ионного канала (300 pS). Свойства ВК-каналов могут модулироваться наличием вспомогательных субъединиц (β , γ), фосфорилированием, окислительным стрессом, влиянием газомедиаторов (нитрозилирование, карбоксилирование, сульфгидратация) и многих других эндогенных метаболитов.

Сероводород является представителем класса газомедиаторов, короткоживущих и легко проникающих через мембрану, образуется эндогенно в цикле метаболизма метионина, субстратом синтеза является гомоцистеин. В нашей работе было показано, что сероводород вызывает кратковременное усиление активности ВК-каналов в культуре GH3 клеток крысы, оказывая модулирующее влияние на экзоцитоз секреторных гранул, и этот эффект зависит от фосфорилирования α субъединицы ВК-каналов. Повышение уровня гомоцистеина в пренатальный период приводит к эмбриотоксичности и отставанию в росте и нарушению развития потомства. Нами было показано, что гомоцистеин и его производные вызывают окислительный стресс и значительно повышают вероятность открытия ВК-каналов, действуя с внутренней стороны мембраны, угнетают Ca^{2+} осцилляции и экзоцитоз секреторных гранул, выделяющих гормон роста, что может лежать в основе нейротоксичности гомоцистеина.

Другой пример, связанный с функцией ВК-каналов, это регуляция сократимости гладкомышечных клеток толстой кишки эндогенными метаболитами микробиоты – короткоцепочечными жирными кислотами. Оказалось, что бутират, ацетат и пропионат натрия приводят к угнетению спонтанной и вызванной активацией Н-холинорецепторов сократимости препарата толстой кишки мыши, что предотвращается блокаторм ВК-каналов – тетраэтиламмонием. Одновременно, было показано, что короткоцепочечные жирные кислоты повышают вероятность открытия одиночных ВК-каналов в GH3 клетках. Эффект короткоцепочечных жирных кислот не проявлялся в модели синдрома раздраженного кишечника, что предполагает участие ВК-каналов в усилении двигательной активности толстой кишки при данной патологии.

Таким образом, ВК-каналы вовлечены в регуляцию различных физиологических функций, а изменение активности/экспрессии ВК-каналов может оказывать вклад в развитие различных патологических процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 20-15-00100).

АДРЕСНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК ПЕРСПЕКТИВА В ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ

А. С. Согомоян^{1, 2, *}, В. О. Шипунова^{1, 2, 3}, С. М. Деев^{1, 2}

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

²Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, Россия

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

*E-mail: annasogomonyan2012@mail.ru

Тераностика – дисциплина, объединяющая терапию и диагностику на одной платформе. Наночастицы различной природы являются наиболее перспективными носителями для создания тераностических агентов и доставки их к органам-мишеням. Для объединения терапии и диагностики в одном препарате используют безопасные для организма наноносители, в которые загружаются различные активные вещества с заданными свойствами. На данный момент исследуют множество материалов-носителей, одними из самых распространенных являются различные полимеры. Для снижения лекарственной дозы и уменьшения побочных эффектов на организм применяется адресная доставка наночастиц. Она реализуется за счет модификации поверхности частиц различными направляющими молекулами, например, антителами, аффибоди, дарпинами и другими.

В данной работе мы демонстрируем синтезированный тераностический наноагент, имеющий адресную молекулу, распознающую HER2 на поверхности раковых клеток. Наноагент представляет собой наночастицу, состоящую из биоразлагаемого, нетоксичного и одобренного FDA полимера поли-лактид-ко-гликолида (PLGA). В PLGA загружены два флуоресцентных красителя Rose Bengal (RB) и Nile Blue (NB). NB в наночастице выполняет диагностическую функцию, а RB – терапевтическую. Для адресной доставки наночастиц к опухоли, их поверхность модифицировали моноклональным антителом трастузумаб. В качестве модельных клеток, экспрессирующих рецептор HER2, использовали линию клеток BT-NanoLuc – рака молочной железы человека.

Нами было показано, что синтезированные частицы адресно связываются с рецептором HER2, эффективно визуализируют опухоли со сверхэкспрессией HER2, а также приводят к гибели раковых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*.

Таким образом, синтезированные наночастицы представляют собой перспективные агенты для тераностики, обладающие как визуализирующими, так и терапевтическими свойствами при фотоиндуцированном внешнем воздействии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-74-30016).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА

К. С. Усачев^{1, 2, *}, Ш. З. Валидов^{1, 2}, М. М. Юсупов^{2, 3}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Федеральный исследовательский центр “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

³Институт генетики и молекулярной и клеточной биологии (IGBMC), Илькириш, Франция

*E-mail: k.usachev@mail.ru

В последнее время наблюдается снижение эффективности лечения инфекционных заболеваний, обусловленное широким применением антибиотиков. Среди активно распространяющихся патогенов выделяют подмножество микроорганизмов с аббревиатурой ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, и *Enterobacter spp.*), представленное наиболее высоковирулентными и устойчивыми к антибиотикам бактериальными патогенами, вызывающими множество внутрибольничных инфекций. Среди них особо нужно отметить штаммы *S. aureus* (MRSA, VRSA), вызывающие острые и хронические инфекции.

На основе методов структурной биологии возможен дизайн новых антибиотиков, ориентируясь на конкретные трехмерные структуры мишеней. Мишенями выступают наиболее важные для жизнедеятельности

клетки биомолекулы (рибосома, РНК и ДНК полимеразы, белковые факторы). В отличие от классических антибиотиков, новые ингибиторы могут быть селективны к конкретным компонентам клетки патогена.

В рамках наших исследований установлены структуры 70S рибосомы *S. aureus* и ее комплексов с лигандами, для которых выявлен ряд специфических отличий как на белковом уровне, так и на уровне рРНК, которые могут выступать в качестве перспективных мишеней для разработки антибиотиков.

Еще одним перспективным направлением для направленной регуляции трансляции патогенов является воздействие на систему гibernации, обеспечивающей выживание в стрессовых условиях. Нами был показан ряд молекулярных механизмов гibernации рибосом *S. aureus*, что позволило создать более полное представление о взаимодействии рибосомальных факторов стационарной фазы с компонентами трансляционного аппарата, и предложить новые мишени для разработки антистафилококковых препаратов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20034).

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ HIF1 ТОПОТЕКАНОМ И ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА БИОМАРКЕРЫ СЕРДЕЧНОЙ И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ГИПОКСИИ

Д. А. Федоров^{1,*}, М. Ю. Фролова¹, И. Е. Красовская¹, Н. В. Кулева¹

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

*E-mail: iilhj@yandex.ru

Использовалась модель гипобарической гипоксии (ТГ) — трехчасовой сеанс пребывания крыс-самцов при 180 мм рт. ст. (5% O₂). Для оценки роли HIF-1 использовали ингибитор трансляции HIF-1 — топотекан, который в смеси ДМСО–0.09% NaCl вводили внутривентриально (5 мг/кг веса) за 10 мин до каждого гипоксического сеанса. В качестве инъекционного контроля использовали смесь ДМСО–0.09% NaCl. Не подвергавшимся гипоксическим воздействиям крысам также вводили топотекан в смеси ДМСО для ингибирования HIF1, либо смесь ДМСО–0.09% NaCl без топотекана. С целью посткондиционирования (ПостК) применяли умеренную гипобарическую гипоксию (УГГ) (Ветровой, 2018). Эксперименты с животными проводили в Лаборатории регуляции функций нейронов мозга Института физиологии им. И.П. Павлова РАН О.В. Ветровым, любезно предоставившим нам плазму крови крыс для биохимических исследований. Плазму крови замораживали при –80°С до момента определения значений биомаркеров с помощью приборов: анализатора иммунохемилюминесценции DXI фирмы “Beckman Coulter” (миоглобин, тропонин I) и биохимического анализатора DXC Unicell фирмы “Beckman Coulter” (общий белок, а также ферментативная активность креатинкиназы общей и креатинкиназы MB).

Было показано (Федоров и др., 2019; Fedorov et al., 2019) достоверное превышение уровня сердечного белка тропонина I в плазме крови крыс, подвергнутых трехчасовой тяжелой гипоксии, что свидетельствовало о повреждении миокарда после ТГ. Результаты выхода в кровь неспецифического мышечного биомаркера повреждения миоглобина при ТГ не обнаружили достоверно значимых изменений после 3 ч ТГ. Эксперимент с использованием ингибитора HIF-1α топотекана показал, что количество миоглобина в плазме крови крыс через сутки после сеанса ТГ было достоверно меньше, чем в отсутствие ингибитора. Таким образом, можно полагать, что блокирование транскрипционного фактора HIF-1 во время ТГ уменьшает повреждение скелетных мышц. При трехкратном ПостК животных после ТГ в сравнении с контрольными животными, которым не вводили топотекан, не были выявлены достоверные изменения исследуемых биомаркеров. Однако при введении топотекана снижался разброс значений биомаркеров, в том числе и у животных, не подвергавшихся гипоксическому воздействию. Так, у животных подвергавшихся трехкратному ПостК после ТГ миоглобин повышался не достоверно (из-за большого разброса у контрольных животных не подвергавшихся гипоксическим воздействиям). Однако по сравнению с также не подвергавшимся гипоксическим воздействиям крысами, которым вводили топотекан, различия средних концентраций общего миоглобина в пересчете на грамм общего белка (мкг/г) были уже достоверны с вероятностью $p > 0.99$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ветровой О.В. 2018. Роль HIF1-зависимой регуляции пентозофосфатного пути в обеспечении реакций мозга на гипоксию. Дис. ... канд. биол. наук. СПб: СПбГУ.

Федоров Д.А., Фролова М.Ю., Красовская И.Е., Кулева Н.В. 2019. Эффекты тяжелой гипобарической гипоксии и ингибирования индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 на маркеры повреждения сердечной и скелетных мышц крыс. Биофизика. Т. 64. № 5. С. 999.

Fedorov D.A., Frolova M.Y., Krasovskaya I.E., Kuleva N.V. 2019. The effects of severe hypobaric hypoxia and inhibition of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) on biomarkers of cardiac and skeletal muscle injury in rats. Biophysics. V. 64. P. 808.

УВЕЛИЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТОННОЙ ТЕРАПИИ С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ГЛИОМЫ

Н. Х. Чан^{3,*}, А. В. Волницкий^{1,2}, Д. А. Амерканов^{1,2}, В. С. Бурдаков^{1,2}, Ф. А. Пак^{1,2}, Е. М. Иванов¹, В. А. Рыжов¹, Я. Ю. Марченко¹, А. Л. Коневега^{1,2,3}, Т. А. Штам^{1,2}

¹НИЦ “Курчатовский институт” – ПИЯФ, Гатчина, Россия

²НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

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

*E-mail: nhanhau.tran92@gmail.com

Глиома – это распространенный тип опухоли головного мозга. Около 26.6% всех опухолей головного мозга представляют собой глиомы, которые возникают в глиальных клетках. В настоящее время лучевая терапия по-прежнему является основным методом лечения опухолей головного мозга. В том числе протонная терапия рассматривается особенно многообещающей, поскольку она позволяет снизить дозу облучения на нормальные ткани за пределами целевого объема. Идея усиления эффективности лучевой терапии онкологических заболеваний за счет использования наночастиц на основе металлов достаточно широко разрабатывается в последние годы, однако многие результаты этих исследований крайне противоречивы. Поэтому изучение действия наночастиц оксида железа (SPIONs) в комбинации с лучевой терапией пока остается актуальной задачей.

Цель данной исследовательской работы – оценка цитотоксического действия SPIONs на клетки различных глиальных линий в широком диапазоне концентраций магнитных частиц и проверка их радиосенсибилизирующего эффекта при облучении протонами на пике Брэгга культивируемых клеток злокачественных глиом.

Цитотоксический эффект SPIONs в диапазоне концентраций 50–400 мкг/мл исследовали с помощью анализа жизнеспособности клеток AlamarBlue. Радиобиологические исследования провели на ряде клеточных линий глиом: A172 и G1-Tr. Клетки инкубировали в среде, содержащей SPIONs, в течение 24 ч, а затем облучали протонами в пике Брэгга на синхроциклотроне СЦ-1000 ПИЯФ (дозы 0–6 Гр). Эффективность облучения определяли с использованием метаболического теста AlamarBlue Assay, а также применяли прямой подсчет числа образовавшихся колоний клеток, окрашенных кристаллическим фиолетовым.

Результаты показали, что в выбранном диапазоне концентраций SPIONs не оказывали значительного цитотоксического влияния на выживаемость опухолевых клеток. При этом клетки линии A-172 более чувствительны к наночастицам оксида железа, чем клетки линии G1-Tr. При облучении протонами на пике Брэгга SPIONs проявляют радиосенсибилизирующие свойства, которые наиболее проявляются в диапазоне доз от 1 до 4 Гр. При этом эффект радиосенсибилизации не наблюдали при высокой дозе облучения (6 Гр) в любой клеточной линии. В результате проведенных исследований продемонстрировано, что комбинированное воздействие SPIONs и протонов на пике Брэгга индуцирует физические и химико-биологические процессы, приводящие к повышению радиочувствительности клеток злокачественных глиом, увеличивая эффективность протонной терапии.

Работа поддержана НИЦ “Курчатовский институт” (приказ № 2757).

ФОТОАКТИВАЦИЯ ПОРФИРИНОВ ВЫЗЫВАЕТ ПОВРЕЖДЕНИЕ МЕМБРАНЫ КЛЕТОК И ПРИВОДИТ К ДЕГРАДАЦИИ ДНК

Г. В. Чашина^{1,2,*}, Л. Л. Тевонян^{1,2}, Х. С. Вишнякова¹, А. Д. Бениаминов¹, Е. Е. Егоров¹, Д. Н. Калужный¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

²Московский физико-физический институт, Долгопрудный, Россия

*E-mail: chashchina.g.v@gmail.com

Порфирины и их производные представляют собой широкий класс природных и синтетических биологически активных соединений, которые рассматриваются как перспективные соединения для фотодинамической терапии онкологических заболеваний. Катионные порфирины способны с высокой аффинностью взаимодействовать с ДНК *in vitro*. Ранее мы показали, что катионный порфирин ZnP1 специфичен к неканоническим структурам ДНК и может служить зондом для определения конформации ДНК (Beniaminov et al., 2016). Однако катионные порфирины известны слабым проникновением в ядро живых клеток, где находится их мишень действия – ДНК. Это затрудняет их использование для направленного противоопухолевого действия и зондирования структуры ДНК *in cellulo*.

Мы провели анализ токсичности цинкового производного порфирина ZnP1 на клеточной линии SK-N-SH (нейробластома человека), который показал низкую темную токсичность ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$) и высокую токсичность ($IC_{50} \sim 50 \text{ nM}$) после освещения светом синего светодиода в течение 30 минут ($\lambda_{\text{макс}} = 460 \text{ nm}$). Анализ локализации ZnP1 в живых клетках SK-N-SH показал, что порфирин окрашивает цитоплазму клеток, но не проникает в ядра. По всей видимости, ядерная оболочка является препятствием для прохождения порфиринов в живые клетки. Не окрашенное порфиринами ядро становится окрашенным после 10 минут освещения синим светом. Вероятно, фотоактивация порфирина приводит к нарушению целостности ядерной мембраны, проникновению порфирина в ядро и образованию комплекса с ДНК.

ДНК, выделенная из клеток сразу же после облучения, оказалась частично фрагментирована. Эффективность фрагментации зависела от времени облучения и концентрации порфиринов. Из наших наблюдений мы можем предположить, что наносимые фотоповреждения ДНК успевают исправляться системами репарации в клетке во время и сразу после воздействия.

Таким образом, порфирин ZnP1 способен проникать в ядра клеток нейробластомы человека SK-N-SH и частично гидролизовать ядерную ДНК при активации синим светом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 20-14-00332).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Beniaminov A.D., Novikov R.A., Mamaeva O.K., Mitkevich V.A., Smirnov I.P., Livshits M.A., Shchyolkina A.K., Kaluzhny D.N. 2016. Light-induced oxidation of the telomeric G4 DNA in complex with Zn(II) tetracarboxymethyl porphyrin. *Nucleic Acids Res.* V. 44. P. 10031.

РОЛЬ Ca^{2+} -АКТИВИРУЕМЫХ K^+ -КАНАЛОВ В ЭФФЕКТАХ БУТИРАТА НАТРИЯ НА ВЫЗВАННЫЕ АГОНИСТАМИ М- И Н-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ СОКРАЩЕНИЯ ТОЛСТОЙ КИШКИ МЫШИ

И. Ф. Шайдуллов^{1,*}, Д. М. Сорокина¹, Ф. Г. Ситдигов¹, Г. Ф. Ситдикова¹

¹Казанский федеральный университет, Казань, Россия

**E-mail: ilnarshaidullov@rambler.ru*

Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), такие как ацетат, пропионат и бутират являются метаболитами кишечной микрофлоры, концентрация которых в просвете кишечника может достигать 150 мМ. Кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости (ВК-каналы) широко распространены в различных тканях, включая нейрональные и гладкомышечные клетки. Недавно было показано, что КЦЖК могут регулировать сократимость гладкомышечных клеток, однако механизмы влияния КЦЖК не изучены. Целью работы было проанализировать роль ВК-каналов в эффектах бутирата натрия на вызванные агонистами никотиновых (Н-) и мускариновых (М-) холинорецепторов сокращения толстой кишки мыши.

Сила сокращения сегментов проксимального отдела толстой кишки мыши длиной 5 мм регистрировалась в изометрических условиях. В течение всего эксперимента препарат омывался аэрированным раствором Кребса. Анализировали сокращения, вызванные агонистами рецепторов ацетилхолина – карбахолин (1 мкМ), бетанехол (100 мкМ, агонист М-холинорецепторов) и эпибатидин (10 мкМ, Н-холинорецепторов).

Бутират натрия угнетал сокращения толстой кишки, вызванные карбахолом и эпибатидином, не оказывая влияния на бетанехол-вызванные сокращения. Кроме того, ингибирующий эффект бутирата предотвращался предварительной аппликацией тетродотоксина, что указывает на то, что энтеральные нейрональные окончания являются мишенью действия бутирата натрия.

Для анализа роли ВК-каналов в эффектах бутирата натрия мышечные сегменты предварительно инкубировали в тетраэтиламмонии в концентрации 1 мМ, который не оказывал влияния на амплитуду вызванных агонистами холинорецепторов сокращений препарата толстой кишки мыши ($n = 6$). В условиях блокирования ВК-каналов ингибирующие эффекты бутирата натрия на амплитуду вызванных карбахолом и активацией Н холинорецепторов эпибатидином сокращений не проявлялись ($n = 6, p < 0.05$).

Таким образом, ингибирующее влияние короткоцепочечных жирных кислот на амплитуду вызванных карбахолом сокращений опосредуются через нейрональные ВК-каналы, активация которых приводит к гиперполяризации мембраны и снижению выброса ацетилхолина из энтеральных нервных окончаний.

Исследование выполнено в рамках программы “Приоритет-2030” и при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-25-20045).

ИНГИБИРОВАНИЕ СЛИЯНИЯ ЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛ ВТОРИЧНЫМИ МЕТАБОЛИТАМИ РАСТЕНИЙ

Е. В. Шекунов^{1,*}, С. С. Ефимова¹, П. Д. Злодеева¹, О. С. Остроумова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: egor_shekunov@mail.ru

Слияние биологических мембран лежит в основе множества биологических процессов. В частности, оболочечные вирусы реализуют свой жизненный цикл посредством слияния с клеткой-мишенью. Новой парадигмой в лечении вирусных инфекций может стать применение ингибиторов вирусного слияния (ИВС), механизм действия которых основан на модификации свойств липидного матрикса вириона. Согласно литературным данным, а также нашему личному опыту, молекулы флавоноидов способны значительно изменять физико-химические свойства липидных модельных мембран. Кроме того, эти вещества обладают противовирусным действием в отношении широкого спектра вирусов. Совокупность этих факторов делает соединения флавоноидного ряда перспективными кандидатами для поиска ингибиторов вирусного слияния с липидопосредованным механизмом действия. В связи с этим, целью данной работы являлась оценка антифузогенной активности вторичных метаболитов растений с последующим выявлением молекулярных механизмов, лежащих в основе их ингибирующего действия.

В ходе исследования методом измерения утечки флуоресцентного маркера кальцеина из малых одноламеллярных липосом фосфатидилхолин/фосфотидилглицерин/холестерин (ФХ/ФГ/Хол) (40/40/20 мол. %) была оценена эффективность применения 19 соединений (концентрация 20 μM) при кальций-опосредованном слиянии. Наиболее выраженным антифузогенным эффектом характеризуются изоликвиритигенин, кверцитин, мирицетин, таксифолин, пицеатаннол (ингибирование более 50%). Для понимания механизмов действия тестируемых соединений (концентрация 375 μM) оценено их влияние на физико-химические параметры ФХ липидных мембран, а именно дипольный потенциал и термотропное поведение мембранообразующих липидов. Отмечено сильное падение стационарного трансмембранного тока на фоне активности флоретина, флоризина, изоликвиритигенина, кверцитина и таксифолина. Существенные модификации — ΔT_m (температура основного фазового перехода) наблюдаются при добавке 4'-гидроксихалкона, кардамона, ликохалкона А, изоликвиритигенина, ресвератрола, пицеатаннола. Изменение $\Delta T_{1/2}$ (ширины пика на полувысоте) регистрируется при добавлении флоретина, 4'-гидроксихалкона, кардамона, ликохалкона А, изоликвиритигенина, таксифолина, пицеатаннола.

Полученные данные свидетельствуют о возможности применения вторичных метаболитов растений в качестве перспективных ИВС с липидопосредованным механизмом действия. Антифузогенный эффект тестируемых соединений, по всей видимости, связан с индукцией положительной кривизны липидных монослоев при адсорбции молекул флавоноидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-15-00417).

СЕКЦИЯ “КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ”

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ НИШИ ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ СОХРАНЯЮТ ПРИЗНАКИ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННОГО ФЕНОТИПА

Л. А. Белик^{1,3,*}, Н. Ю. Семенова², А. В. Чубарь¹, Н. И. Енукашвили^{1,2}

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

²Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

³Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

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

Множественная миелома (ММ) — неизлечимое онкогематологическое заболевание, основным симптомом которого являются обширные повреждения костной ткани. При заболевании ММ гемопоэтическая ниша (ГН) костного мозга подвергается перестройкам и поддерживает жизнедеятельность опухолевых клеток. Одним из важнейших элементов ГН являются мезенхимные стромальные клетки (МСК). При развитии ММ и взаимодействии с опухолевыми клетками МСК, в составе опухолевого микроокружения, изменяют свои свойства, в том числе способность к дифференцировке в остеогенном направлении, и способствуют развитию ММ. В здоровой ГН в регуляции остеогенеза участвует консервативный сигнальный путь Wnt. Ключевым посредником канонической передачи сигналов Wnt является β -катенин. При ММ сигнализация Wnt

нарушается, что приводит к нарушениям формирования костной ткани. Таким образом, целью работы являлось определение остеогенного потенциала МСК после лечения и изменение уровня транскрипции генов Wnt и β -катенина в МСК больных ММ при первичной постановке диагноза и после лечения.

В исследование были включены здоровые доноры (НД) и пациенты с различным статусом ответа на терапию (бортезомибсодержащие индукционные схемы): полный ответ или частичный ответ (PoCR), ответ не достигнут (NR) ($n = 24$). В эксперимент по определению уровней транскрипции также включили группу пациентов, не проходивших терапию (UT). МСК выделяли из аспиринов костного мозга. Для исследования остеогенного дифференцировочного потенциала их культивировали в среде для индукции остеогенной дифференцировки. Уровни транскрипции генов Wnt и β -катенина определяли с помощью ПЦР в реальном времени, проводящейся на выделенной из МСК кДНК. Для NR и PoCR МСК обнаружили снижение остеогенного потенциала по сравнению с НД МСК. У NR МСК остеогенный потенциал был снижен сильнее, чем у PoCR МСК. Уровни транскрипции генов Wnt, а также гена β -катенина были изменены у пациентов с ММ по сравнению с НД. Результаты свидетельствуют о сохранении измененных при развитии ММ свойств МСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (№ 075-15-2021-1075 от 28.09.2021).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ СО СФЕРОИДАМИ, СФОРМИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

М. М. Бирюков^{1, 2, *}, Е. А. Патракова^{1, 2}, О. А. Коваль^{1, 2}, Е. В. Милахина³, Д. Э. Закревский³, И. В. Швейгер⁴

¹Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

³Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: biryukov.mm@ya.ru

Холодная плазма — частично ионизированный газ с температурой, не превышающей 40°C, что позволяет использовать ее для воздействия на биологические объекты, в том числе для борьбы с опухолями. Традиционно цитотоксическое воздействие тестируют на двумерных клеточных моделях, которые не отражают архитектуру опухоли и градиенты концентраций различных соединений. В качестве моделей, более точно отражающих характеристики опухолей, можно использовать трехмерные модели, наиболее простыми представителями которых являются сфероиды.

Целью работы было изучение влияния холодной плазмы на сфероиды, сформированные опухолевыми и нормальными клетками человека.

В работе использовали устройство, разработанное коллективом сотрудников ИФП и ИТПМ СО РАН и генерирующее холодную плазменную струю (ХПС). Кроме прямого облучения с непосредственным контактом ХПС со средой, в которой находились сфероиды, применяли также и не прямое, или опосредованное облучение, при котором среда облучалась отдельно, а затем добавлялась к культивируемым сфероидам. Сфероиды из клеток аденокарциномы легкого A549 и фибробластов легкого Wi-38 формировали в лунках культуральных планшетов, покрытых слоем агарозного геля, предотвращающего адгезию клеток. Сфероиды из клеток MCF7-EGFR, гиперэкспрессирующих EGFR человека, были склонны к спонтанному сферообразованию в стандартных условиях культивирования (Troitskaya et al., 2021).

На первом этапе были оптимизированы параметры культивирования для формирования сфероидов из клеток A549 и Wi-38 на агарозном геле: концентрация геля, количество высеваемых клеток, состав питательной среды. Формирование сфероидов детектировали уже на второй день культивирования на 1%-ной агарозе в среде DMEM/F-12. Полученные сфероиды росли и сохраняли свою целостность в течение минимум 14 дней.

Как прямое, так и не прямое воздействие ХПС на сфероиды вело к их разрушению. Методом проточной цитометрии было установлено увеличение количества погибающих клеток на 23 и 34% при прямом и опосредованном воздействии по сравнению с контролем. Кроме того, с помощью окрашивания сфероидов реагентом H₂DCFDA, с последующим анализом методом флуоресцентной микроскопии, обнаружено повышение концентрации внутриклеточных активных форм кислорода и азота в облученных раковых клетках в составе сфероидов. Также показано усиление фагоцитарной активности макрофагов в отношении сфероидов, облученных ХПС.

В работе впервые изучено влияние холодной плазмы на сфероиды из клеток A549, Wi-38 и MCF7-EGFR. Полученные данные позволяют лучше понять механизм взаимодействия активных частиц, генерируемых в потоке ХПС, с клетками человека.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (проект № 19-19-00255-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Troitskaya O. et al. 2021. EGFR transgene stimulates spontaneous formation of MCF7 breast cancer cells spheroids with partly loss of HER3 receptor. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22: 12937.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОМЛ *IN VITRO* И *IN VIVO* ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Д. А. Богданова^{1,*}, И. А. Караман¹, Ю. В. Ермолаева¹, Д. К. Плотников¹, Е. Д. Колосова¹,
К. А. Левчук², Л. Л. Гиршова^{1,2}, Е. В. Байдюк¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУ “НМИЦ им. В.А. Алмазова” Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: dasha35Irus@gmail.com

Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) является одним из самых распространенных онкогематологических заболеваний, характеризующихся высокой летальностью. В основе ОМЛ лежат многочисленные мутации в различных генах, которые приводят к нарушениям дифференцировки клеток костного мозга, дисплазии и гиперпролиферации клеток миелоидного ряда. В связи с полигенной природой заболевания во многих случаях противоопухолевая терапия оказывается неэффективной, и подбор наиболее правильного метода лечения является первоочередной задачей в онкогематологии.

Для тестирования новых протоколов лечения ОМЛ нами были выбраны три клеточные линии, введенных в культуру от пациентов с ОМЛ, обладающие различным спектром мутаций: OCI-AML2, OCI-AML5, Mono-Mac1. Данные линии были протестированы на чувствительность к ингибитору анти-апоптозного белка Bcl-2, Венетоклаксу. Для увеличения эффективности Венетоклакса мы решили скомбинировать данный препарат со специфическим химическим ингибитором фосфатазы Wip1, GSK2830371. Фармакологическая инактивация Wip1 ведет к активации p53-сигнального каскада и повышенной экспрессии транскрипционной мишени p53, про-апоптозного гена *Bax*, что, согласно нашей гипотезе, должно усиливать эффект инактивации анти-апоптозного Bcl2 Венетоклаксом и увеличивать гибель опухолевых клеток. Методом МТТ-тест на клеточную жизнеспособность и цитометрическим анализом PI-позитивных гибнущих клеток было показано, что комбинация Венетоклакса и GSK гораздо эффективнее уничтожает лейкозные клетки OCI-AML2 и OCI-AML5, чем монотерапия. Линия Mono-Mac1 оказалась резистентной как к Венетоклаксу, так и к комбинации препаратов. Для тестирования эффективности новых протоколов противоопухолевой терапии *in vivo* нами была создана генетическая конструкция, несущая наиболее яркий и стабильный флуоресцентный белок дальне-красного цвета, Rhubarb. Нами были получены изогенные линии ОМЛ с экспрессией Rhubarb, что позволит нам увеличить проникающую способность прижизненного биомиджинга и с большей эффективностью детектировать колонии лейкозных клеток, поражающих глубоколежащие внутренние органы, при трансплантации иммунодефицитным мышам NSG. С целью выбора наиболее оптимального пути трансплантации клеток ОМЛ мы сравнили результативность приживления линий ОМЛ и клеток, полученных от пациентов с ОМЛ (Patient derived xenografts), проходящих лечение в НМИЦ им. Алмазова, используя различные способы трансплантации лейкозных клеток, внутривенное и интратрибиальное.

В итоге нами были получены пилотные данные о высокой эффективности комбинации современных таргетных препаратов, Венетоклакса и GSK2830371, *in vitro*, и подготовлена модель ОМЛ для тестирования новых лекарственных соединений *in vivo* в иммунодефицитных мышах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (проект № 19-75-20128). Работа Д.А. Богдановой частично финансировалась в рамках программы Сириус.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ КАПСУЛ ДЛЯ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА К ОПУХОЛЕВЫМ КЛЕТКАМ

Ю. С. Бугрова^{1,*}, А. А. Горохова¹, Н. Ю. Шилиягина¹, М. В. Новоселова², Д. А. Горин², И. В. Балалаева¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

²Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

*E-mail: yla.bugrova@yandex.ru

Фотодинамическая терапия (ФДТ) — терапевтический метод лечения онкологических заболеваний, основанный на накоплении фотосенсибилизатора (ФС) в клетках с его последующей активацией светом. Од-

ним из ограничений развития данного метода является недостаточная селективность накопления ФС в опухоли. Для решения данной проблемы могут быть использованы наноразмерные носители.

Целью данной работы являлось исследование перспективности применения в качестве носителей для доставки ФС многослойных полимерных капсул. Капсулы были получены путем послойного формирования слоев гидрохлорида поли-L-аргинина и натриевой соли декстрансульфата на частице ватерита, предварительно загруженного фотосенсибилизатором, с последующим растворением ватеритного ядра. Были получены и исследованы два вида частиц: диаметром 50 нм (2 слоя полимеров) и 150 нм (4 слоя полимеров).

В качестве фотосенсибилизатора использовали фотодитазин (Фд). Было проведено сравнение 3 вариантов загруженных капсул: капсулы с диаметром 50 нм и содержанием Фд 1.6×10^7 молекул/частицу, капсулы 150 нм с содержанием Фд 0.6×10^7 молекул/частицу, а также такие же капсулы 150 нм с более низкой концентрацией Фд 3.6×10^6 молекул/частицу. Эксперименты проводили на клеточной линии эпидермоидной карциномы человека А-431. Анализ накопления и распределения образцов проводили с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии Axio Observer Z1 LSM-710. Внутриклеточную локализацию Фд анализировали с использованием специфических красителей на органеллы: LysoTracker, ER-Tracker, MitoTracker и BODIPY FL C5-керамид в комплексе с BSA для аппарата Гольджи. Сравнительный анализ световой и темновой цитотоксичности капсул с Фд и самого соединения без носителя был проведен методом МТТ-теста.

Результаты исследований продемонстрировали разное поведение капсул. Капсулы меньшего диаметра быстрее поступали в клетки, их содержимое выходило и перераспределялось в цитоплазме клеток, окрашивая мембранные структуры, предположительно ЭПР и аппарат Гольджи. При введении фотодитазина в составе крупных капсул он накапливался в клетках намного медленнее, и большая часть фотосенсибилизатора задерживалась или в самих капсулах, или в везикулах в течение трех суток, лишь небольшое количество поступало в цитоплазму. Фотодинамическая активность у 50 нм капсул оказалась выше, чем у свободного фотодитазина, в то время как у 150 нм образцов она была сильно снижена. На основании полученных данных нами был сделан вывод, что 50 нм капсулы исследованного состава могут рассматриваться в качестве возможного средства доставки фотосенсибилизатора к опухолевым клеткам.

Работа выполнена при финансовой поддержке НЦМУ “Центр фотоники” (соглашение с Минобрнауки РФ № 075-15-2020-927) и Российского научного фонда (проект № 20-74-10114), а также при поддержке Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ПРОТЕОГЛИКАНЫ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА КАК НОВАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ САРКОМЫ ЮИНГА

Е. А. Васильева^{1,*,**}, Д. Ф. Аматруда¹

¹Детская больница Лос-Анджелеса, Университет Южной Калифорнии, Калифорния, США

*E-mail: evasileva@chla.usc.edu

**E-mail: elenavasileva.sci@gmail.com

Саркома Юинга – это злокачественная опухоль костей и мягких тканей с чрезвычайно плохим прогнозом для пациентов с метастатическим или рецидивирующим заболеванием. Саркома Юинга ассоциирована с появлением транслокации между 11-й и 22-й хромосомами (t (11;22) (q24;q12)), приводящей к синтезу онкогенного белка EWSR1-FL11. Несмотря на значительный прогресс в изучении саркомы Юинга, механизмы трансформации клеток и причины прогрессирования опухолей остаются недостаточно глубоко изученными. В последние годы стало понятно, что внеклеточный матрикс и секретируемые факторы важны для возникновения и прогрессирования заболевания. В отсутствие репрезентативной генетической *in vivo* модели роль взаимодействия опухолевых клеток и их микроокружения в патогенезе саркомы Юинга недостаточно хорошо изучена. Мы разработали новую генетическую модель саркомы Юинга, интегрировав онкоген человека EWSR1-FL11 в геном рыбок *Danio rerio*. Подобная экспрессия EWSR1-FL11 вызывает быстрое развитие саркомы Юинга в рыбах. Эта инвазивная модель позволяет изучать поведение раковых клеток, меченных GFP, во время инициации и прогрессирования опухоли в сложном контексте развивающегося организма, что в настоящее время невозможно у млекопитающих. Мы обнаружили, что наблюдаемые опухоли экспрессируют канонические маркеры саркомы Юинга, включая CD99. Протеомный анализ показал, что экспрессия EWSR1-FL11 влияет на экспрессию ферментов, участвующих в метаболизме сульфатированных протеогликанов. Нарушение регуляции метаболизма протеогликанов приводит к активации ERK1/2 сигнального каскада, способствуя пролиферации и выживаемости опухолевых клеток. Применение антагониста сульфатированных протеогликанов сурфена снижает пролиферацию и выживаемость клеток саркомы Юинга *in vitro* и *in vivo*. В совокупности наша новая генетическая модель саркомы Юинга открывает новые возможности

для изучения механизмов возникновения заболевания. Наши результаты подчеркивают потенциал лекарственных препаратов, таргетирующих сульфатированные протеогликаны для противоопухолевой терапии.

УБИКВИТИНЛИГАЗА PIRH2 ВЛИЯЕТ НА СТАБИЛЬНОСТЬ И АКТИВНОСТЬ БЕЛКА PARP1

Ю. Д. Васильева^{1,*}, С. Е. Парфеньев¹, О. А. Федорова¹, Н. А. Барлев¹, А. А. Дакс¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: v.julia.2002@icloud.com

Поли(АДФ-рибоза)-полимераза PARP1 играет ключевую роль в поддержании стабильности генома. Показано, что данный фермент связывается с одно- и двунитевыми разрывами, запуская различные механизмы репарации. Повышенная активность PARP1 способствует выживанию опухолевых клеток, а также опосредует развитие резистентности к генотоксической терапии. Ингибиторы PARP1 на сегодняшний день являются перспективными противоопухолевыми препаратами. Также известно, что разрезание полноразмерной формы белка PARP1 на фрагменты молекулярной массой 24 и 89 кДа является одним из маркеров апоптоза. Таким образом, исследование механизмов регуляции активности PARP1 имеет важное значение как для фундаментальной науки, так и для поиска новых стратегий противораковой терапии.

На первом этапе мы исследовали спектр межбелковых взаимодействий PARP1 методом GST pull-down с последующим масс-спектрометрическим анализом выделенных белков. В результате было показано, что одним из интерактантов PARP1 является E3 убиквитинлигаза Pirh2. Валидация выявленного белок-белкового взаимодействия производилась с помощью вестерн-блот анализа.

Далее мы проанализировали влияние статуса Pirh2 в клетках рака молочной железы человека MCF7 на уровень PARP1 и показали, что нокдаун Pirh2 вызывает стабилизацию белка PARP1. Кроме того, мы продемонстрировали, что в клетках с нокдауном Pirh2, обработанных доксорубицином, наблюдается снижение интенсивности фрагментации PARP1 на фоне повышения уровня других маркеров генотоксического стресса и апоптоза, по сравнению с контрольными клетками. Полученные данные свидетельствуют об изменении функционирования PARP1 при подавлении Pirh2.

Известно, что окислительный стресс индуцирует PARP1-зависимое поли(АДФ)-рибозилирование множества субстратов, необходимое для активации молекулярных механизмов нейтрализации активных форм кислорода. На клетках РМЖ MCF7 и рака легкого H460 нами было продемонстрировано, что уровень тотального парилирования белков в ответ на обработку клеток перекисью водорода был снижен в клетках с нокдауном Pirh2. Данный результат также подтверждает наше предположение о влиянии белка Pirh2 на функциональную активность PARP1.

Таким образом, в результате данного исследования мы показали, что убиквитинлигаза Pirh2 физически взаимодействует с поли(АДФ)-рибозилазой PARP1, а также влияет на ее стабильность и активность в раковых клетках человека в условиях генотоксического стресса.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-75-10059).

ИНГИБИРОВАНИЕ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ SONIC HEDGEHOG В СОЧЕТАНИИ С ПРОТОННЫМ И ГАММА-ОБЛУЧЕНИЕМ

А. В. Гарина^{1, 2, 3,*}, А. В. Волницкий^{1, 2}, В. С. Бурдаков^{1, 2}, Н. Х. Чан³, Д. А. Амерканов^{1, 2},
Ф. А. Пак^{1, 2}, А. Л. Коневега^{1, 2, 3}, Т. А. Штам^{1, 2}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский Институт” – Петербургский институт ядерной физики, Гатчина, Россия

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Гатчина, Россия

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

*E-mail: garina_av@pnpi.nrcki.ru

Протонная терапия используется для лечения многих видов злокачественных опухолей. Благодаря свойствам протонов, можно облучать опухоли, труднодоступные для хирургического вмешательства. Протонная терапия обладает принципиальным клиническим преимуществом перед обычной фотонной терапией, связанным с характеристиками распределения глубинной поглощенной дозы протонов.

Глиомы – это инвазивные, быстро прогрессирующие опухоли головного мозга, которые плохо поддаются стандартной терапии. Злокачественная трансформация связана с потерей клеточной дифференцировки. Возможной причиной этого процесса является активация механизмов, поддерживающих стволоподобные свойства клеток. Данные литературы указывают на то, что сигнальный путь Sonic Hedgehog является одним

из таких механизмов. Он связан с развитием и делением клеток глиом, а также с устойчивостью к гамма-облучению и миграционной способностью. Поэтому в научном сообществе намечается тенденция к изучению ингибирования пути Sonic Hedgehog в сочетании с лучевой терапией. Целью нашего исследования было изучение потенциала ингибитора GANT61 в качестве радиосенсибилизатора и сравнение потенциальной разницы между протонным облучением и гамма-облучением.

Опухолевые клетки предварительно инкубировали с GANT61 и облучали протонами на пике Брэгга на синхроциклотроне СЦ-1000 (энергия: 200 МэВ) НИЦ КИ ПИЯФ (градуированные дозы 0.5–6 Гр). Клетки также облучали с использованием подъемного ^{60}Co источника γ -лучей “Исследователь” (дозы 2–6 Грей). В другой группе экспериментов клетки злокачественных опухолей сначала облучали теми же возрастающими дозами, затем добавляли ингибитор, чтобы продемонстрировать его аддитивный эффект. Чувствительность к излучению определяли с помощью MTS-теста и анализа колоний.

Применение ингибитора GANT61 имело слабый радиосенсибилизирующий эффект при данных типах облучения. Наблюдаемый аддитивный эффект может быть объяснен биологическим влиянием GANT61 на клеточный цикл. Сочетание ингибирования пути Sonic Hedgehog с облучением более эффективно снижало жизнеспособность глиом по сравнению с одним только облучением.

Исследование поддержано НИЦ “Курчатовский институт” (Приказ № 2757).

ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПА КЛЕТОК ЛИНИИ SKOV-3 И ИХ СТЕПЕНИ ИНВАЗИИ ОТ ОСОБЕННОСТЕЙ АРХИТЕКТониКИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫХ МАТРИКСОВ

С. Д. Гефтер¹, А. Д. Поспелов¹, Д. Б. Трушина^{2,3}, И. В. Балалаева¹

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

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

³Федеральный научно-исследовательский центр “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: sofia.gieftier.00@mail.ru

Особенности структуры и состава внеклеточного матрикса (ВКМ) могут приводить к поведенческой и фенотипической модификации опухолевых клеток. Изменения во взаимодействии опухолевых клеток с ВКМ могут способствовать их активной пролиферации и процессу метастазирования. Изучение аспектов прогрессирования опухолей в зависимости от ВКМ можно проводить на моделях опухолевого роста на основе специально обработанных тканей – децеллюляризованных (ДЦЛ) матриксов, подвергающихся заселению конкретными клетками – процессу рецеллюляризации. В данной работе было решено рассмотреть зависимость фенотипа опухолевых клеток и их степени инвазии в матриксы различного происхождения от таких биомеханических параметров как плотность организации матриксных волокон и размер матриксных пор. Объектом исследования были выбраны клетки аденокарциномы яичника человека линии SKOV-3.

ДЦЛ матриксы выделялись из органов лабораторной мыши линии BALB/c посредством метода децеллюляризации с использованием детергентов: 0.5% Triton X-100, 0.5% SDS, 1% SDC, 0.075% SDS. Выдержка образцов проводилась на орбитальном шейкере по 1 ч в первых трех растворах, и 24 ч – в четвертом растворе. Отмывка от детергентов проводилась двойной инкубацией в растворах PBS по 24 ч. Насыщение матриксов питательными веществами проводилось путем выдерживания образцов в полной ростовой среде DMEM 72 ч.

Рецеллюляризация проводилась в течение недели с принудительным введением клеточной суспензии в количестве 2×10^6 клеток в 200 мкл среды на каждый ДЦЛ матрикс в 1, 3 и 5 дни. Между повторными этапами заселения матриксы инкубировали в полной ростовой среде в лунках планшета с пониженной адгезией при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Для оценки фенотипа клеток и степени заселенности ими ДЦЛ матриксов проводили стандартное гистоморфологическое исследование. Для определения структуры и плотности образцов часть ДЦЛ матриксов подвергали сканирующей электронной микроскопии (Hitachi TM4000Plus).

По результатам данного исследования была выявлена следующая закономерность: мезенхимальный фенотип опухолевых клеток линии SKOV-3 коррелирует с высокой степенью инвазии и демонстрируется в ДЦЛ матриксах с крупным диаметром пор и преимущественно рыхлыми матриксными волокнами, характерными для тканей легких и печени, в то время как более эпителиальный фенотип исследуемых клеток коррелирует с низкими показателями заселенности и проявляется в матриксах с меньшей пористостью и более плотной структурой волокон, характерных для тканей селезенки и яичника. ДЦЛ матрикс почки по степени инвазии занимает промежуточное положение, демонстрируя мезенхимальный фенотип заселенных клеток и большие поры, но достаточно высокую плотность. Таким образом, мы можем предположить, что вероят-

ность образования вторичных опухолевых очагов аденокарциномы яичника в тех или иных органах будет зависеть от архитектоники внеклеточного матрикса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проекты № 19-74-20168 и № 21-74-10058), а также при поддержке Программы стратегического академического лидерства “Приоритет- 2030” Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

ИНГИБИРОВАНИЕ ТРАНСГЛУТАМИНАЗЫ 2 ТИПА СЕНСИБИЛИЗИРУЕТ КЛЕТКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО С ДИКИМ ТИПОМ p53 К ГЕНОТОКСИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

Ю. А. Гненная^{1,*}, Е. Ю. Смирнов¹, Н. А. Барлев¹

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

**E-mail: gnennaya1996@mail.ru*

По данным Американского онкологического общества, по состоянию на 2022 г., ожидается 1.9 млн новых случаев заболевания, среди которых самым распространенным случаем с последующим летальным исходом является рак легких и бронхов. Современные методы изучения молекулярных механизмов канцерогенеза легких позволили выявить новые белки-мишени для таргетной лекарственной терапии, особый интерес среди которых представляют белки, способствующие метастазированию и активации антиапоптотических каскадов, к которым относится трансглутаминаза 2 типа (TG2).

TG2 является высококонсервативным ферментом, катализирующим Ca^{2+} -зависимое трансамидирование белков. Конформационные изменения белковой структуры наделяют TG2 способностью проявлять также GTP-азную, серин-треонин-специфическую киназную и протеиндисульфидизомеразную активности. Известно, что изменение активности или регуляции TG2 может привести к возникновению ряда неопластических и фибропролиферативных заболеваний, включая злокачественные опухоли и фиброз легких, почек и сердца. Помимо внутриклеточных функций, TG2 опосредует взаимодействие интегринов с фибронектином и связывает белки внеклеточного матрикса в межклеточном пространстве, что, в свою очередь, влияет на метастазирование опухолевых клеток. По литературным данным известно, что высокий уровень TG2 в клетках почечно-клеточной карциномы (ПКР) коррелирует с низкой выживаемостью пациентов и повышенной устойчивостью к химиотерапевтическим препаратам, в то время как ингибирование TG2 подавляет рост опухоли ПКР p53-опосредованной индукцией апоптоза. Однако роль TG2 в модуляции активности онкосупрессора p53 в контексте рака легкого остается невыясненной.

Для исследования потенциального механизма взаимодействия TG2 с p53 нами были получены изогенные клеточные линии A549 (дикий тип p53) и H1975 (мутантный p53) с нокаутом и оверэкспрессией TG2 соответственно. Далее анализ характера изменений p53 и его белков-мишеней проводился с помощью метода Вестерн блот и ОТ-ПЦР. Влияние TG2 на изменение устойчивости к генотоксическим препаратам и пролиферативного потенциала клеток оценивали с помощью клонногенного и МТТ-тестов, а также на клеточном анализаторе RTCA xCelligence eSight. В совокупности полученные данные свидетельствуют о том, что только p53 дикого типа является субстратом для активности TG2. Дальнейшая работа предполагает исследование подробного механизма TG2-опосредованной деградации p53 и возможного участия MDM2 в данном процессе.

Исследование поддержано Мега-грантом № 14.W03.31.0029.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ПРОДУКЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ, ПОДВЕРГНУТЫХ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

А. А. Горохова^{1,*}, Н. Н. Пескова¹, И. В. Балалаева¹

¹*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*

**E-mail: anastasiya-dosaeva@yandex.ru*

Фотодинамическая терапия (ФДТ) — это уникальный малоинвазивный метод лечения рака и некоторых других заболеваний, механизм которого основан на производстве активных форм кислорода (АФК) путем активации фотосенсибилизатора (ФС) видимым светом в присутствии молекулярного кислорода. Пероксид водорода привлекает наибольший интерес среди продуцируемых АФК вследствие его возможности выступать инициатором сигнальных каскадов в клетке. Таким образом, целью данной работы было изучение динамики вторичного образования пероксида водорода в ответ на фотодинамическое воздействие в присутствии гидрофильных и мембранотропных фотосенсибилизаторов.

Для анализа содержания пероксида водорода в компартментах живых клетках нами были созданы клеточные линии эпидермоидной карциномы человека с цитоплазматической и митохондриальной локализацией генетически кодируемого пероксид-чувствительного сенсора *HuPer*. Были использованы два типа фотоактивных красителей: фталоцианиновый фотосенсибилизатор Фотосенс® (далее PhS) (НИОПИК, Россия) и новое фотоактивное соединение арилцианопорфиразиновой группы – тетраакис(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразин (далее Pz) (Институт металлоорганической химии РАН, Россия). Продукцию пероксида водорода в клетках, подвергнутых ФДТ, анализировали путем мониторинга параметров флуоресценции сенсора *HuPer*, а именно отношения интенсивности флуоресценции сенсора при длинах волн возбуждения 488 и 405 нм. Нами было зафиксировано наличие лаг-периода между облучением и накоплением пероксида в клетках, и его продолжительность зависела от дозы облучения. Вторичное накопление пероксида водорода в цитоплазме клеток, вызванное фотодинамическим воздействием с PhS, локализованным в лизосомах, происходит раньше, чем в митохондриях. Напротив, мембранотропный Pz вызывает массовую продукцию пероксида в митохондриях с последующим его накоплением в цитоплазме. В ходе ингибиторного анализа в клетках был использован синтетический антиоксидант N-ацетил-L-цистеин (NAC), что ингибировало фотодинамическое накопление пероксида. С помощью ратиометрического флуоресцентного сенсора BCECF-AM было показано, что фотодинамическое воздействие не влияет на уровень pH в клетке в течение периода наблюдения.

На основании полученных данных мы предполагаем, что фотосенсибилизаторы с различными физико-химическими свойствами и внутриклеточной локализацией могут запускать разные механизмы не только первичной, но и вторичной продукции АФК, оказывая влияние на работу митохондриальных электрон-транспортных систем и ферментов, генерирующих АФК в цитоплазме клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (государственное задание № 0729-2020-0061), а также при поддержке Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ ФЕНОТИПА СТАРЕЮЩИХ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ КОЖИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ОПУХОЛЕВОГО СУПРЕССОРА P53

Д. А. Дашкова*

Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

**E-mail: dashkova_dasha2001@mail.ru*

Актуальность. В аспекте изучения регуляции прогрессии рака кожи – меланомы, отличающейся образованием ранних метастазов и высокой устойчивостью к терапевтическим препаратам, не теряет актуальности опухолевый супрессор белок p53, выполняющий апоптотические функции и формирующий SASP-фенотип (senescence-associated secretory phenotype – секреторный фенотип, ассоциированный со старением), участвующий в аресте клеточного цикла.

Цель: исследование регуляторных аспектов реализации неапоптотических функций белка p53, служащего мишенью для онко-микроРНК miR-155-5p, в формировании фенотипа стареющих клеток меланомы под воздействием алкилирующего цитостатика Дакарбазин.

Материалы и методы. Исследование проводилось на клеточных линиях меланомы BRO и SK-MEL-2, которые культивировались в CO₂-инкубаторе, в питательной среде RPMI-1640 с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки – 10% FBS и 1% антибиотика/антимикотика. Инкубировали клетки с алкилирующим цитостатиком Дакарбазин в концентрации равной 1xIC50. В качестве контроля клетки инкубировали с добавлением ДМСО. Иммуноцитохимическим методом оценивали экспрессию p53 путем окрашивания моноклональными антителами к данному белку, докрасивание ядер осуществлялось флуоресцентным красителем DAPI. Флуоресцентная оценка осуществлялась с помощью системы имиджинга Fluid Cell Imaging Station – полуколичественным методом. На основе выделенной микроРНК из экзосом клеток меланомы ставили реакцию обратной транскрипции, затем реакцию амплификации в режиме реального времени для оценки уровня экспрессии онко-микроРНК miR-155-5p, в качестве контроля использовали некодирующую РНК U6. Эксперимент осуществляли в трех повторах. В статистической обработке результатов использовали непараметрический критерий Манна–Уитни.

Результаты. Под воздействием цитостатического агента уровень p53 не изменился по отношению к контролю в клеточной линии BRO, в SK-MEL-2 уровень p53 увеличился на 12.5% ($p < 0.05$), что указывает на активацию экспрессии данного белка. Онко-микроРНК miR-155-5p экспрессировалась в экзосомах клеток меланомы BRO и SK-MEL-2, что свидетельствует о ее присутствии в данных клеточных линиях и действии

на опухолевую прогрессию. Под воздействием цитостатика Дакарбазин уровень miR-155-5p не изменился по отношению к контролю в клеточной линии BRO, в SK-MEL-2 уровень miR-155-5p снизился на 2.5% ($p < 0.05$), что свидетельствует об ингибировании данной онко-микроРНК. Посредством биоинформационного анализа было обнаружено, что miR-155-5p оказывает ингибирующее действие на экспрессию p53, что, вероятно, приводит к активации онкогена.

Выводы. В клеточной линии меланомы SK-MEL-2 происходит снижение активации канцерогенеза под воздействием цитостатического агента за счет снижения экспрессии онко-микроРНК в экзосомах и miR-155-5p-опосредуемого увеличения экспрессии опухолевого супрессора p53 с формированием фенотипа стареющих клеток.

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ НА СПОСОБНОСТЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ИНДУКЦИИ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ДО ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ОБРАЗОВАНИЕМ МАММОСФЕР

Д. С. Долгашева^{1,2,*}, Е. А. Здрева^{1,2}, М. К. Ибрагимова¹, Н. В. Литвяков¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии Томского НИМЦ РАН, Томск, Россия

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

*E-mail: normikus.18.97@gmail.com

Цель работы. Изучить способность дифференцированных опухолевых клеток (ДОК) молочной железы к дедифференцировке до опухолевых стволовых клеток (ОСК) и образованию маммосфер в присутствии ингибиторов генов стволовости.

Материалы и методы. Клеточные линии рака молочной железы (MCF-7 и T47D) культивировали в полных питательных средах IMDM и DMEM. Анализ транскриптома и экспрессии генов стволовости проводились на микрочипах CytoScan™ HD Array и Clariom™ S Assay, human соответственно. Субпопуляционный состав изучали на проточном цитометре с использованием моноклональных антител к поверхностным белкам CD44 и CD24. ДОК отбирали на клеточном сортере Sony SH800. Для стимуляции дедифференцировки применяли IL-6, подавление дедифференцировки осуществляли с помощью ингибиторов генов *Tert*, *Myc*, *Notch1*: VIBR1532, 10058-F4 и FLI-06 соответственно.

Результаты. Количество ДОК у MCF-7 составляет 13% от общей популяции, у T47D – 29%. Клетки MCF-7 дикого типа спонтанно образуют маммосферы без индукции IL6 на 14 сутки культивирования, а в присутствии IL6 на 14 и 21 сутки маммосферы становятся крупнее. ДОК MCF-7 без IL6 образуют на 21 сутки лишь мелкие сфероиды, тогда как с IL6 маммосферы образуются уже на 14 сут. Показано, что на 3 и 21 сут роста в группе ДОК + IL6 более чем в 2 раза снижается экспрессия *Vim*, *Tert* и *Lmn2* и повышается экспрессия *Klf4*. На этапе маммосферообразования, на 21 сутки, в группе ДОК + IL6 усиливается экспрессия *Lmn2*, *Sox4*, *Fzd1*, *Myc*, *Bmi1*, *Klf5*, *Smad9*, *Smad4*, *Smad2*, *Hif3A* и снижается *Dppa4*, *Snai2*, *Sox1*, *Fli3*. Показано, что T47D способна к спонтанной дедифференцировке и маммосферообразованию без стимуляции IL6. ДОК образуют сфероиды без IL6 на 3 сут роста, а на 7 сут – полноценные маммосферы. Ингибиторы VIBR1532 и 10058-F4 блокируют дедифференцировку ДОК T47D до ОСК и активность ОСК в клетках дикого типа. FLI-06 снижает дедифференцировку ДОК до ОСК, на 14 и 21 сут роста в группе ДОК + FLI-06 обнаружены сфероиды. Также FLI-06 снижает активность ОСК в культурах дикого типа и блокирует пролиферацию. Комбинация ингибиторов в ДОК T47D подавляет дедифференцировку до ОСК. Ингибитор VIBR1532 подавляет экспрессию 11 генов стволовости (*Myc*, *Fzd9*, *Nanog*, *Smad2*, *Smad4*, *Fzd1*, *Smo*, *Mob3B*, *Igf1*, *Bmi1*, *Tgfbr1*) и активирует *Klf6* и *Lat*. Ингибитор 10058-F4 подавляет экспрессию *Myc*, *Nanog*, *Fzd9*, *Mob3B*, *Tgfbr1* и *Pim1* и повышает активность *Sox2*, *Klf4*, *Klf6*, *Klf1*, *Smad2*, *Smad9*, *Lifr*, *Lnmb2*, *Zeb1*, *Bmp6*, *Hif3A*. FLI-06 снижает в 2 и более раз экспрессию *Vim*, *Dppa4* и *Fzd9* и не препятствует дедифференцировке ДОК. Все три ингибитора подавляют, более чем в 2 раза, экспрессию 12 генов стволовости (*Nanog*, *Lnmb2*, *Lifr*, *Myc*, *Zic2*, *Klf6*, *Mob3B*, *Tgfbr1*, *Fzd9*, *Bmi1*, *Smad4*, *Igf1*).

Заключение. Показано, что подавление экспрессии генов стволовости предотвращает дедифференцировку нестволовых опухолевых клеток до ОСК. Ингибирование 3 из 9 амплифицированных в T47D генов стволовости предотвращает дедифференцировку ДОК до ОСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-15-00243).

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ХЛОРОФИЛЛИНА**Н. А. Елизарьев^{1,*}, О. В. Шевченко¹, И. Н. Черненко¹, Н. А. Змитрович¹***¹Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, Владивосток, Россия***E-mail: n.elizarev@m.tgmu.ru*

Согласно статистическим данным, представленным МНИОИ им. П.А. Герцена за 2021 г., количество смертей от злокачественных новообразований составляет 199 случаев на 100 000 населения в России. Одним из способов лечения злокачественных новообразований является фотодинамическая терапия (ФДТ), которая одобрена клинически и применяется при лечении рака кожи, горла, мочевого пузыря, головы и шеи, легких. Большую распространенность для этой терапии получили фотосенсибилизаторы – вещества, способные поглощать световые лучи с инициацией фотохимической реакции в клетках, например, хлорофиллин. Данное биологически активное вещество избирательно накапливается в опухолевой ткани и имеет высокую фотодинамическую активность.

Исследование действия хлорофиллина проводили на модели асцитной аденокарциномы Эрлиха (концентрация 1×10^6 кл/мл), клетки которой инкубировали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 0.05% гентамицина. Клетки были разделены на 6 групп: 1 – контрольные необлученные клетки, 2 – после облучения красным светом длиной волны 645 нм в течение 15 мин, 3 и 4 – необлученные после контакта с хлорофиллином и Фотодитазином (активный компонент хлорин еб), 5 и 6 – после контакта с указанными веществами и облученные красным светом длиной волны 645 нм в течение 15 мин, после чего все клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂. Жизнеспособность клеток исследовали на 1 и 4 сут, окрашивая ДНК-маркером 7-AAD и детектором мембранного потенциала митохондрий флуоресцентным зондом Jc-1 с последующим анализом на проточном цитофлуориметре MACSQuant Analyzer 10. Также проводились исследования на цитотоксичность с помощью МТТ-теста, для выявления эффективных доз, и генотоксичность, методом щелочного кометного анализа, для обчета параметров которого использовалась программа CaspLab.

При исследовании цитотоксичности методом МТТ-теста в качестве эффективных доз были выбраны следующие: 1.56; 3.125; 6.25; 12.5 мкг/мл. На основании сравнительного параметра TailLength на 3 сут при воздействии хлорофиллина в дозе 6.25 мкг/мл и облучения длина “хвоста” кометы (подтверждающая степень поврежденности ДНК) составила 472 ед., в то время как для хлорина еб 239 ед. Контрольные показатели для необлученных и облученных клеток составили 133 и 154 ед. соответственно. При анализе с помощью проточного цитофлуориметра и ДНК-маркера 7-AAD на 1 и 4 сутки были получены следующие показатели: 90.9 и 94.9% некротизированных клеток при воздействии хлорофиллина в дозировке 6.25 мкг/мл с облучением и фотодитазина в аналогичной дозировке с облучением 82.4 и 76.6% соответственно. Показатели для облученных образцов без воздействия веществ на 1 сут составили 9.13% и на 4 сут – 33.6%. Таким образом, результаты проведенных экспериментов подтверждают перспективу дальнейших исследований противоопухолевого эффекта хлорофиллина.

ХАРАКТЕРИСТИКА ДОРМАНТНЫХ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ КОЖИ**А. Р. Есимбекова****Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия***E-mail: aleksandra.esimbekova.96@mail.ru*

Среди общего пула опухолевых клеток обнаруживаются мало пролиферирующие G₀-положительные клетки, функционирование которых связано с развитием резистентности. Такие клетки могут находиться в дормантном, “спящем” состоянии неопределенное время, а затем, под воздействием различных импульсов, переходить в активно-пролиферативное состояние, обуславливая рецидив заболевания. Противоопухолевые препараты, действуя как повреждающие факторы, могут индуцировать переход опухолевых клеток в G₀, что позволяет этим клеткам сохранять устойчивость к терапии.

Цель. Охарактеризовать клетки меланомы, находящихся в G₀ фазе клеточного цикла.

Материалы и методы. Клетки меланомы кожи линии SK-MEL-2 инкубировали с дакарбазином в концентрации IC₅₀ и 2IC₅₀, предварительно определенной на основе МТТ. Оценка изменений клеточного цикла проводилась на основе проточной цитометрии и иммуцитохимического исследования с маркером клеточной пролиферации Ki-67. С помощью микрочипирования на системе Gene Atlas (“Affymetrix”, CA, США) был получен транскриптом клеток. Биоинформатический анализ проводился на базе Panther 13.1. Оценка

адгезивных свойств клеток проводилась путем воздействия на них центробежной силы. Определение доли стареющих клеток основывалось на оценке активности лизосомальной бета-галактазидазы, активность которой ассоциирована со старением. Статистическая обработка проводилась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни ($p < 0.05$).

Результаты. По результатам проточной цитометрии под воздействием дакарбазина в концентрации IC50 и 2IC50 наблюдалось увеличение доли клеток в G₀ фазе клеточного цикла пропорционально повышению концентрации дакарбазина и уменьшение доли клеток, находящихся в G₁ фазе. Аналогичные изменения количества G₀-положительных клеток наблюдались при иммуноцитохимическом исследовании. По итогам транскриптомного анализа к числу сигнальных путей с наиболее выраженными изменениями относятся: “Ангиогенез”, “Клеточный цикл” и “Сигнальный путь p53”. По итогам эксперимента с воздействием на клетки центробежной силой было выявлено, что дакарбазин не изменял уровень клеточной адгезии. Однако среди адгезивных клеток наблюдался повышенный процент G₀-положительных клеток. По итогам пробы с гидролизом β-галактозидов после воздействия дакарбазина наблюдалось увеличение доли клеток, экспрессирующих β-галактозидазу, все же не превышающей 2%.

Выводы. Таким образом, было установлено, что цитостатический препарат дакарбазин увеличивает долю опухолевых клеток, находящихся в фазе покоя. Под воздействием дакарбазина наблюдались изменения клеточного цикла, пролиферации, репарации и адгезии клеток. Клетки меланомы кожи в фазе покоя обладают повышенными адгезивными свойствами. Дакарбазин в концентрации IC50 вызывает увеличение пула не только спящих, но и стареющих клеток. Большая часть клеток в пуле G₀ – обратимо спящие клетки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ соглашения 19-15-00110).

МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ НЕК293 ПРИ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ АНАЛОГОВ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК GAS5

Н. Д. Зинченко^{1,*}, Ю. И. Савиновская¹, М. С. Ермаков¹, А. А. Нуштаева¹, Е. В. Кулигина¹, Д. В. Семенов¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: nikita.zinchenko.1994@mail.ru

Длинные некодирующие РНК являются Pol 2-транскриптами длиной более 200 нуклеотидов, не кодирующими белок. ДнРНК являются регуляторным фактором, участвующим в таких клеточных процессах, как репликация, транскрипция, трансляция, онкогенез и апоптоз.

Ген GAS5 (growth arrest specific 5) человека кодирует 10 C/D-боксов малых ядрышковых РНК и днРНК GAS5. ДнРНК GAS5 является представителем класса нкРНК, для которого установлены онкосупрессивная и проапоптотическая функции. Известно, что уровень днРНК GAS5 снижен в клетках злокачественных новообразований человека. Повышение уровня днРНК GAS5 в раковых клетках ведет к снижению пролиферации, жизнеспособности и к активации проапоптотических процессов. Поэтому днРНК GAS5 является перспективным объектом для создания новых стратегий диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Целью данной работы является анализ функций днРНК GAS5 в клетках человека НЕК293Т в условиях эктопической экспрессии аналогов данной днРНК.

Для этого нами были получены ДНК-конструкции, кодирующие аналоги днРНК GAS5 под контролем CMV-промотора. Фибробласты почек эмбриона человека НЕК293Т трансфицировали полученными векторами. Анализировали транскриптом полученных трансфектантов с использованием платформы Illumina 1500. Установлено, что эктопическая экспрессия днРНК GAS5 сопровождается повышением уровня 165 и понижением уровня 84 РНК. Также установлено, что днРНК GAS5 модулирует активность факторов транскрипции SUZ12 и EZH2, составляющих коровую часть поликомб-комплекса PRC2. Поликомб-комплекс PRC2 является одним из важнейших эпигенетических регуляторов транскрипции генов.

Таким образом, наши данные позволяют заключить, что действие днРНК GAS5 в клетках обусловлено влиянием этой РНК на компоненты PRC2, модулируя его активность в процессах компактизации/декомпактизации хроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержке по бюджетному проекту ИХБФМ СО РАН № АААА-А17-117020210023-1.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА BENZETHONIUM CHLORIDE НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ АППАРАТ И МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК РАКА ЛЕГКОГО С РАЗЛИЧНЫМ СТАТУСОМ EGFR**Е. Д. Колосова^{1,*}, Е. В. Байдюк¹, В. А. Голотин¹, О. Ю. Шувалов¹, Н. А. Барлев^{1,2}**¹*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*²*Московский физико-технический институт, Москва, Россия***E-mail: katunetchka_l@mail.ru*

Рак легкого является одной из главных причин смерти от онкологических заболеваний во всем мире. При этом немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет 75–80% всех случаев. Устойчивость раковых клеток к традиционным методам лечения (химиотерапии и лучевой терапии) зачастую объясняется гиперэкспрессией EGFR или возникновением в нем мутаций, приводящих к постоянной его активации, например, точечной мутации в 21 экзоне гена EGFR (L858R). Для лечения таких опухолей в настоящее время применяются препараты, ингибирующие киназную активность EGFR – тирозинкиназные ингибиторы (ТКИ). Появление дополнительных мутаций в гене EGFR является наиболее распространенным механизмом развития устойчивости к ТКИ. Более половины опухолей, устойчивых к ТКИ, несут точечную мутацию в 20 экзоне гена EGFR (T790M). Поскольку стандартные методы лечения не обладают желаемой эффективностью, поиск новых лекарственных комбинаций является актуальным. Ранее при скрининге лекарств, одобренных FDA, нами было отобрано несколько препаратов, которые в сочетании с ТКИ проявляли синергический эффект в подавлении роста клеток НМРЛ с двойной мутацией EGFR. В данной работе мы исследовали механизм действия одного из выбранных препаратов, Benzethonium chloride (BenzCl), на клетки НМРЛ с различным статусом EGFR.

Работа проведена на линии НМРЛ человека NCI-H1299, в которой с помощью системы редактирования генов CRISPR/Cas9 были последовательно введены точечные мутации в 21 (L858R) и 20 (T790M) экзонах гена EGFR. Также исследования проводились на клеточной линии НМРЛ, не подвергавшейся геномному редактированию – NCI-H1975, несущей двойную мутацию в гене EGFR. С помощью электронно-микроскопического исследования мы выявили, что через сутки после воздействия на клетки H1299 L858R/T790M и H1975 препаратом BenzCl в концентрации 5 мкм происходило набухание митохондрий, их средняя площадь увеличивалась более, чем в 2 раза, практически полностью исчезали кристы. При этом митохондриальный потенциал клеток с двойной мутацией EGFR снижался на 80%, тогда как в клетках с диким типом EGFR только на 20%. Оценку мембранного потенциала митохондрий проводили с помощью проточной цитометрии и красителя TMRM. Исследование метаболизма клеток с помощью Seahorse Real-Time Cell Metabolic Analysis показало, что через 16 ч инкубации с 5 мкм BenzCl в клетках H1299 как с диким, так и с мутантным EGFR, уровень окислительного фосфорилирования (ОКСФОС) снижался в 3 раза, при этом уровень гликолиза в клетках с диким типом EGFR не изменялся, а в клетках с мутантным EGFR увеличивался в 2 раза. Через сутки после воздействия препаратом уровень ОКСФОС снижался практически до нуля, а гликолиз возвращался к контрольным значениям. Таким образом, BenzCl влияет на морфологию митохондрий, значительно снижает мембранный потенциал митохондрий и уровень ОКСФОС клеток НМРЛ, при этом клетки с двойной мутацией в гене EGFR являются более чувствительными к данному препарату.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 20-15-00189).

α-АКТИНИН-4 ВОВЛЕЧЕН В РЕГУЛЯЦИЮ ВЫБОРА ПУТИ РЕПАРАЦИИ ДВУЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В КЛЕТКАХ H1299**Д. В. Кригер^{1,*}, К. С. Новицкая¹, Г. В. Васильева¹, Е. В. Ломерт¹, Н. Д. Аксёнов¹, Д. Г. Тентлер¹**¹*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия***E-mail: daryamalikova@gmail.com*

α-актинин-4 (ACTN4) – это актин-связывающий белок, который ассоциирован с адгезией и миграцией клетки. Он играет ключевую роль в организации трехмерной структуры фибрилл актинового цитоскелета и его взаимодействия с клеточной мембраной. Однако стоит отметить, что ACTN4 также вовлечен в регуляцию клеточного цикла, эпителиально-мезенхимального перехода, репликацию ретровирусов, активацию ядерных рецепторов и может выступать в качестве ко-активатора NF-κB. Было обнаружено, что многие типы рака характеризуются повышенным уровнем экспрессии ACTN4. К сожалению, такие пациенты имеют худший прогноз выживаемости по сравнению с пациентами с низкой экспрессией ACTN4. На данный момент в литературе ACTN4 рассматривается в качестве потенциального прогностического маркера успешного лечения генотоксическими препаратами для больных немелкоклеточным раком легкого. В связи с чем мы предположили, что ACTN4 может быть вовлечен в регуляцию ответа клетки на повреждение ДНК.

Для проверки нашей гипотезы мы использовали клетки линии H1299 с подавленной экспрессией АСТN4 (АСТN4КО) и при помощи анализа ДНК комет и фокусов гистона γ H2AX обнаружили, что уровень экспрессии АСТN4 обратно коррелирует с эффективностью репарации ДНК после обработки клеток этопозидом и доксорубицином. При помощи репортерных конструкций, основанных на репарации гена GFP, мы обнаружили, что в клетках АСТN4КО усиливается путь негомологичного воссоединения концов (NHEJ), а репарация при помощи гомологичной рекомбинации (HR) существенно подавлена.

Далее, для подтверждения данных, полученных с помощью репортерных плазмид, мы произвели оценку динамики ключевых факторов, вовлеченных в регуляцию NHEJ и HR, таких как ATM, 53BP1 и BRCA1 при помощи методов иммуноцитохимии. С этой целью клетки обрабатывались этопозидом в течение 40 мин для внесения разрывов ДНК, после чего культивировались в течение 4 ч для репарации образовавшихся двухцепочечных разрывов (DSB). Активация ATM является очень ранним событием в ходе репарации разрывов ДНК и необходима для активации репарации как путем NHEJ, так и HR. Мы не выявили никакой корреляции между фосфорилированной формой ATM и экспрессией АСТN4. Однако мы обнаружили, что после внесения разрывов количество фокусов 53BP1 в клетках с пониженной экспрессией АСТN4 выше по сравнению с контролем, а количество фокусов pBRCA1, наоборот, ниже. Через 4 ч репарации DSB количество фокусов 53BP1 и BRCA1 было снижено в клетках АСТN4КО, аналогично анализу фокусов гистона γ H2AX.

Эти данные подтверждают наши полученные ранее результаты о важной роли АСТN4 в регуляции клеточного ответа на повреждения ДНК. Мы предполагаем, что АСТN4 вовлечен в регуляцию сборки комплексов с участием 53BP1, тем самым препятствуя преждевременной активации NHEJ в пользу HR. Межбелковые взаимодействия АСТN4, определяющие его участие в репарации ДНК, требуют дальнейшего изучения.

НОВАЯ МОДЕЛЬ РЕЦИДИВА ОПУХОЛЕВОГО РОСТА ПОСЛЕ ХИМИОТЕРАПИИ У МЫШЕЙ

Л. С. Кузнецова^{1,*}, М. С. Истомина², Б. А. Маргулис¹, И. В. Гужова¹, В. Ф. Лазарев¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: lyubakuznetsov@gmail.com

Рецидив опухоли представляет собой процесс повторной опухолевой прогрессии после терапевтического воздействия. При этом вновь сформированная опухоль характеризуется более агрессивным поведением. В частности, склонностью к образованию метастазов, а также устойчивостью к широкому спектру лекарственных препаратов. При грамотно подобранной терапии большая часть опухоли погибает, однако в силу опухолевой гетерогенности, некоторые клетки оказываются резистентными к лекарственным препаратам и выживают. Множество исследований демонстрирует, что факторы, высвобождаемые умирающими клетками, способны стимулировать прогрессию выжившей части опухоли. Такое явление показано при некротическом и апоптотическом способах клеточной гибели в моделях *in vitro* и *in vivo*, и в литературе обычно называется компенсаторной пролиферацией. Однако в большей части подобных моделей *in vivo* используется радиотерапевтическое воздействие, к тому же не учитывается связь рецидива опухоли и ее последующего метастазирования.

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 этопозидов 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 вышеописанные 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).

ГЕНЕТИЧЕСКИ ЗАКОДИРОВАННАЯ МЕТКА ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОГО ОТСЛЕЖИВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

М. К. Леонова^{1, *}, С. С. Водопьянов^{1, 2}, Н. С. Чмелюк^{1, 3}, В. В. Ода¹, В. А. Саркисова^{2, 4},
А. С. Семкина^{3, 5}, А. В. Иванова¹, А. Н. Габашвили¹

¹Лаборатория “Биомедицинские наноматериалы”, Национальный исследовательский технологический университет “МИСиС”, Москва, Россия

²Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Кафедра медицинских нанобиотехнологий, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

⁴Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта, Москва, Россия

⁵Отдел фундаментальной и прикладной нейробиологии, Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. Сербского, Москва, Россия

*E-mail: leonovamasha19@gmail.com

Согласно данным всемирной организации здравоохранения, рак молочной железы является самым распространенным видом рака в мире. Существует большое количество животных моделей для различных типов рака молочной железы, позволяющих исследовать рост опухоли, а также метастазирование и ангиогенез. При изучении этих процессов важно иметь возможность в течение длительного времени неинвазивно отслеживать опухолевые клетки.

Визуализация опухолевых клеток *in vivo* может осуществляться с использованием оптических методов, а также методом МРТ. Для оптической визуализации часто используются флуоресцентные белки, квантовые точки и различные флуоресцентные красители. Общим недостатком таких меток является малая глубина проникновения, их применение представляется возможным только для поверхностных тканей у мелких животных. Другим существенным недостатком является снижение интенсивности флуоресцентного сигнала по мере пролиферации клеток. Для отслеживания опухолевых клеток методом МРТ часто используются СПИО наночастицы. Одним из недостатков является то, что они дают отрицательный контраст, который трудно интерпретировать. Кроме того, интенсивность МР-сигнала будет снижаться вследствие пролиферации клеток, как и в случае использования флуоресцентных меток. Другая проблема заключается в том, что наночастицы могут выбрасываться опухолевыми клетками и захватываться фагоцитирующими клетками опухолевого микроокружения, что ухудшит точность визуализации. Таким образом, актуальной задачей является поиск метки, лишенной вышеуказанных недостатков.

В настоящем исследовании мы представляем метку на основе инкапсулина бактерии штамма *Quasibacillus thermotolerans* (Qt), генетически закодированную в клетках карциномы молочной железы мыши 4T1 (4T1-Qt). Метка представляет собой белковую оболочку диаметром 42 нм, содержащую внутри себя фермент — ферроксидазу. При добавлении к клеткам препарата двухвалентного железа, ферроксидазы окисляет двухвалентное железо до трехвалентного с образованием магнитных наночастиц. Кроме того, в клетки были встроены гены, кодирующие переносчик металлов mZip14, необходимый для улучшения транспорта железа в клетки. Гены были встроены в геном клеток посредством лентивирусной трансдукции, что позволило получить стабильную клеточную линию. Было продемонстрировано, что генетически кодируемая метка не оказывает влияния на жизнеспособность и скорость пролиферации клеток, наличие магнитных наночастиц, образующихся в инкапсулинах путем биоминерализации, позволяет визуализировать клетки 4T1-Qt методом МРТ, а полученные клетки не обладают иммуногенностью и приживаются с образованием подкожных опухолей при имплантации в мышей линии BALB/c. Таким образом, полученная клеточная линия может быть использована для моделирования карциномы молочной железы у мышей с дальнейшей долгосрочной визуализацией клеток методом МРТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-75-00096).

КОМПЛЕКС HSP70-НМGB1 СТИМУЛИРУЕТ ВОЗОБНОВЛЕНИЕ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА ПОСЛЕ ХИМИОТЕРАПИИ**М. А. Микеладзе^{1,*}, Д. В. Сверчинский¹, И. В. Гужова¹, Б. А. Маргулис¹**¹*Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия***E-mail: Marinamikeladze.cytspb@gmail.com*

Возобновление опухолевого роста после химиотерапии является одной из актуальных проблем онкологии. Известно, что при подобном способе лечения основная часть новообразования погибает, высвобождая в межклеточное пространство паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMPs). Такие молекулы могут по-разному влиять на развитие онкологического процесса, активируя противоопухолевый ответ организма или стимулируя репопуляцию выживших раковых клеток.

Одним из важных DAMPs является белок НМGB1, активная внеклеточная форма которого опосредует онкогенную функцию иммунных клеток, обеспечивая нишу для повторного образования опухоли. Помимо НМGB1, в процессе репопуляции участвует ряд других DAMPs, таких как белки теплового шока, в частности, белок теплового шока 70 (Hsp70). Известно, что Hsp70 способен взаимодействовать с белковыми молекулами для сохранения их функциональной активности в стрессовых условиях.

Мы предположили, что одним из клиентских белков Hsp70 является НМGB1, а образование экзогенного комплекса Hsp70-НМGB1 в условиях химиотерапии может оказывать значительный эффект на процессы опухолевой репопуляции.

В экспериментальной части были использованы две клеточные модели: A549 – немелкоклеточный рак легкого и DLD1 – колоректальная аденокарцинома человека. В качестве терапевтических агентов выбраны препараты: оксалиплатин и этопозид. Мы установили, что кондиционная среда (КС), полученная от обработанных препаратами клеточных культур, стимулирует пролиферацию наивных клеток. Это подтверждало, что КС содержит факторы, определяющие активность опухолевого процесса. Исходя из нашего предположения, одним из таких факторов являлся комплекс Hsp70-НМGB1, а его формирование должно было происходить внутри клеток в момент действия химиотерапии. Используя метод конфокальной микроскопии, мы определили, что внутриклеточная колоколизация белков происходила спустя 8 ч после добавления препаратов. Далее необходимо было доказать, что комплекс высвобождается из поврежденных клеток в КС, что мы и обнаружили, применяя метод иммунопреципитации. В качестве захватывающего агента использовали антитела против Hsp70, что позволило удалить белок вместе с клиентом-НМGB1. Затем нами таким же образом были получены КС без комплекса. На последнем этапе работы клетки инкубировали с КС без комплекса, и было доказано, что в отсутствии в КС Hsp70-НМGB1, пролиферация и образование колоний снижается ~ в 2 раза по сравнению с контрольными значениями.

В совокупности полученные данные подтвердили проопухолевую роль экзогенного комплекса Hsp70-НМGB1 в процессе репопуляции раковых клеток после химиотерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-20161).

ВЛИЯНИЕ ОБЩЕЙ АНЕСТЕЗИИ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ**Е. Р. Михайлова^{1,*}, И. В. Гужова¹, Б. А. Маргулис¹, Е. А. Леонова², С. М. Ефремов²**¹*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*²*Клиника высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия***E-mail: mikhailovaer@yandex.ru*

Хирургическое лечение раковых заболеваний невозможно без применения общей анестезии. Препараты для общей анестезии могут не только оказывать иммуносупрессивное влияние на организм человека, но и влиять на синтез белка теплового шока БТШ70 в опухолевых клетках, что приводит к рецидиву онкологических заболеваний. В настоящее время вопрос рисков рецидива и метастазирования опухолей при применении того или иного вида анестезии изучался только с позиции иммуносупрессивного влияния на человека. В нашем исследовании мы впервые показываем влияние ингаляционной, внутривенной и комбинированной анестезии на синтез белка теплового шока БТШ70, повышающего устойчивость клеток опухоли к воздействию неблагоприятных факторов (в том числе к воздействию химиотерапии), и, как следствие, повышающего их выживаемость и способность к метастазированию. Мы выяснили, что внутривенная анестезия, в отличие от ингаляционной, повышает уровень синтеза БТШ70 в раковых клетках, в то время как ингаляционная анестезия повышает метаболическую активность и их способность к миграции. Полученные данные помогут более тщательно выбирать вид анестетика для онкохирургии.

ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**А. С. Могиленских^{1, 2, *}, Е. В. Гребенюк^{1, 2}, Е. О. Шамшурина¹, С. В. Сазонов^{1, 2}, С. М. Демидов^{1, 2}**¹ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, Екатеринбург, Россия²ГАУЗ СО “Институт медицинских клеточных технологий”, Екатеринбург, Россия

*E-mail: annasajler@yandex.ru

Актуальность. При создании первичной клеточной культуры клеток карциномы молочной железы (КМЖ) используются различные протоколы. В случае с КМЖ в образцах опухоли присутствует большое количество фибробластов, пролиферирующих гораздо быстрее, чем эпителиальные клетки (Могиленских, Сазонов, 2021). Поэтому важно выбрать такой способ культивирования, при котором большее количество клеток демонстрируют эпителиальный фенотип.

Материалы и методы. Материал был получен от пациенток в ходе хирургического вмешательства. Получение клеточных культур осуществлялось согласно схеме (Патент на промышленный образец № 124425). После получения первичной культуры клетки, образовавшие маммосферы, помещали в другой флакон. Для иммуноцитохимического (ИЦХ) исследования после образования монослоя клетки открепляли и пересаживали на предметные стекла. Исследования проводились в автостейнере Dako Link. Для определения фенотипа опухоли использовали антитела anti-Pan Keratin (AE1/AE3/РСК26) Primary Antibody (Roche diagnostics, USA). Подсчет положительно окрашенных клеток осуществлялся при подсчете не менее 600 клеток, определялось среднее арифметическое значение окрашенных клеток, стандартная ошибка среднего арифметического, а также доверительный интервал для среднего (ДИ) с помощью программы MS Excel. Для выявления достоверности различий между двумя выборками применялся критерий Стьюдента.

Результаты. При получении первичных культур было обнаружено две группы клеток. Первая группа демонстрировала тенденцию к слиянию и образованию островков монослоя с ровными границами (адгезивная культура). Вторая группа клеток формировала сфероиды (маммосферы) диаметров 30–40 мкм с темным центром.

При ИЦХ анализе экспрессии панцитокератина в адгезивной культуре на втором пассаже $35.4 \pm 8\%$ среднее значение с доверительной вероятностью 95% находится в диапазоне ДИ = 19–51%. На третьем пассаже уровень клеток, экспрессирующих панцитокератин, вырос до $45 \pm 11\%$ (ДИ = 21–68%). В неадгезивной культуре на втором пассаже уровень составил $16.7 \pm 5\%$ (ДИ = 6–27%). На третьем пассаже $33 \pm 8\%$ (ДИ = 16–49%). Согласно критерию Стьюдента существенных различий между полученными данными нет. Однако в случае с маммосферами большее количество клеток демонстрируют эпителиальный фенотип.

Выводы. Исследование показало, что эпителиальная природа клеток сохраняется как в адгезивной культуре, так и в культуре, полученной из маммосфер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Могиленских А.С., Сазонов С.В. 2021. Создание клеточных линий карциномы молочной железы. Гены и Клетки. Т. 16. № 1. С. 15.

Патент на промышленный образец № 124425 Российская Федерация. Схема этапов получения первичной клеточной культуры карциномы молочной железы: № 2020504224: заявл. 14.09.2020; опубл. 24.03.2021 / А.С. Могиленских, Ф.А. Фадеев, Д.В. Седнева-Луговец [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Уральский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И УСТОЙЧИВЫХ К ЦИСПЛАТИНУ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА НСТ116 ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИСПЛАТИНА**А. В. Моршнева^{1, *}, О. О. Гнедина¹, Д. Н. Киндт¹, М. В. Иготти¹**¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: amorshneva@incras.ru

Проблема резистентности опухолевых клеток к действию препаратов химиотерапии является одним из ключевых факторов, осложняющих терапию опухолей и существенно снижающих ее эффективность. Не чувствительные к воздействию препарата клетки выживают и затем возобновляют пролиферацию, что приводит к рецидиву заболевания. В связи с этим, выявление механизмов устойчивости опухолевых клеток к терапевтическому воздействию является актуальной задачей для поиска новых подходов к терапии рецидивирующих опухолей.

Удобной моделью для исследования механизмов формирования и преодоления лекарственной устойчивости является пара клеточных линий, включающая линию исходных родительских клеток, чувствительных к препарату интереса, а также полученную на ее основе устойчивую линию. Ранее нами была создана подобная модель для изучения механизмов резистентности к цисплатину, развивающихся в клетках аденокарциномы толстого кишечника НСТ116. Целью данной работы является сравнительный анализ распределения по клеточному циклу родительских чувствительных клеток НСТ116 и цисплатин-устойчивых клеток НСТ116/С при действии цисплатина.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла проводили на проточном цитометре с окрашиванием ДНК йодистым пропидием (PI) в контроле и при действии 18 мкМ цисплатина в течение 24, 48 и 72 ч для чувствительных и устойчивых к цисплатину клеток. Согласно нашим результатам, чувствительные клетки НСТ116 при действии цисплатина оказываются неспособны пройти контрольную точку в фазе G2 клеточного цикла, накапливаясь на границе фаз G2/M, и запускают программу апоптоза, о чем свидетельствует увеличение доли клеток с субдиплоидным содержанием ДНК. Устойчивые клетки НСТ116/С при действии цисплатина также накапливаются в фазе G2/M, при этом длительное пребывание в G2/M-блоке не сопровождается гибелью клеток, как происходит в исходных чувствительных клетках.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что устойчивость клеток НСТ116/С к цисплатину не связана с механизмами выброса цисплатина из клеток, поскольку реализуется блок клеточного цикла, характерный для клеток с поврежденной ДНК, что, по-видимому, связано с накоплением ДНК-аддуктов в результате действия цисплатина. Можно предположить, что в устойчивых клетках НСТ116/С подавлена проапоптотическая программа, в результате чего клетки с ДНК-аддуктами платины выживают и затем, по мере устранения повреждений, возвращаются в клеточный цикл, однако точный механизм устойчивости клеток линии НСТ116/С еще предстоит исследовать. В дальнейшем линия НСТ116/С может стать моделью для поиска новых подходов для борьбы с устойчивыми популяциями опухолевых клеток, в частности, основанных на совместном действии ДНК-повреждающих препаратов с агентами, нацеленными на компоненты апоптотического сигналинга.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) (проект № 22-25-20229).

ВЛИЯНИЕ ГИСТОН-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ SET7/9 НА УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК К ПОВРЕЖДЕНИЯМ ДНК

Д. А. Мяделец^{1, *}, С. Е. Парфеньев¹, Ю. Д. Васильева¹, О. М. Семенов¹, Н. А. Барлев^{1, 2}, А. А. Дакс¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Московский физико-технический институт, Москва, Россия

*E-mail: st085384@student.spbu.ru

Посттрансляционные модификации являются ключевым механизмом регуляции транскрипции генов и функционирования белков, с помощью которого клетки адаптируются к воздействиям окружающей среды, определяют траектории специализации и характер прохождения стадий клеточного цикла. Лизиновая N-метилтрансфераза Set7/9 способна метилировать ряд белков, что может влиять на характер экспрессии генов, в регуляции которых задействованы данные белки.

В данной работе исследовалась устойчивость к генотоксическому стрессу клеток с различным статусом Set7/9. В качестве модели использовалась панель клеточных линий рака молочной железы с разным статусом p53 (SKBR3, MDA-MB-231, MDA-MB-468 и MCF7), в которых с помощью лентивирусной трансдукции была подавлена экспрессия Set7/9.

Данные клеточные линии подвергали воздействию цитотоксическим веществом цисплатином, вызывающим повреждения ДНК. После чего анализировали влияние уровня Set7/9 на экспрессию генов, кодирующих факторы репарации ДНК, и белки-транспортёры, участвующие в формировании множественной лекарственной устойчивости. Анализ экспрессии генов проводили с помощью вестерн-блот анализа и количественной ПЦР в реальном времени.

В результате данного исследования мы показали, что при подавлении Set7/9 наблюдается повышение экспрессии генов, участвующих в эксцизионной репарации ДНК и ABC-транспортёров, выводящих токсические вещества из клетки. На сегодняшний день известно, что факторы эксцизионной репарации играют важную роль в формировании туморогенных характеристик раковых клеток и являются мишенями направленной противораковой терапии. ABC-транспортёры, в свою очередь, опосредуют развитие множественной лекарственной устойчивости раковых клеток. Их повышенная экспрессия способствует развитию резистентности опухолей к различным типам химиотерапии.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о роли метилтрансферазы Set7/9 в регуляции ответа на генотоксический стресс и формировании туморогенных характеристик клеток рака молочной железы человека. Мы полагаем, что уровень экспрессии Set7/9 может рассматриваться как биомаркер для подбора оптимальной терапии пациентов с раком молочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 19-75-10059).

СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА И ИНГИБИТОРА ОПУХОЛЕВОГО РОСТА НУТЛИНА НА ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЕ

С. Р. Нецветай^{1,*}, О. А. Федорова¹, А. А. Дакс¹, А. И. Гудович¹, О. Ю. Шувалов¹,
С. Е. Парфеньев¹, Н.А. Барлев¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: sofanets17@gmail.com

Известно, что метформин, являясь широко используемым антидиабетическим препаратом класса бигуанидов, проявляет противоопухолевую активность. Терапевтический эффект связан с активизацией АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК). Метформин оказывает влияние на регуляцию пролиферации, клеточного цикла, апоптоза и аутофагии в различных типах раковых образований, таких как рак легкого, молочной и поджелудочной желез, меланомы.

Целью данного исследования являлась оценка сочетанного действия нутлина (Nutlin 3) и метформина на клетки рака легкого. Нутлин является аналогом цис-имидазолина, который селективно подавляет рост раковых клеток за счет ингибирования взаимодействия убиквитин-лигазы MDM2 и p53. MDM2 способствует деградации основного онкосупрессора p53 в протеасомах. Таким образом, нутлин приводит к стабилизации белка p53 в раковых клетках и подавлению пролиферации.

Для оценки метаболической активности применялся колориметрический МТТ-тест, отражающий жизнеспособность клеток. Клетки рака легкого А549, Н1299 и Н460 были обработаны метформином различной концентрации в сочетании с нутлином. Наши исследования показали, что сочетанное действие нутлина и метформина приводило к подавлению пролиферации клеток. Кроме того, мы показали, что добавление нутлина к клеточным линиям приводило к стабилизации MDM2. При этом мы показали, что MDM2 активирует аутофагию в клеточных линиях рака легкого. Аутофагия — это естественный внутриклеточный процесс деградации дефектных или избыточных белков, а также поврежденных органелл. Мы предполагаем, что молекулярный механизм заключается в активации аутофагии при сочетанном действии нутлина и метформина.

Полученное наблюдение имеет большое значение для дальнейших исследований, направленных на изучение способов повышения эффективности действия противоопухолевых препаратов, их комбинированного воздействия, которые, возможно, найдут применение в доклинической и клинической практике.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 18-75-10076).

НАКОПЛЕНИЕ ПРЕЛАМИНА А, ИНДУЦИРОВАННОЕ ФОЗИНОПРИЛОМ И БАТИМАСТАТОМ, ИЗМЕНЯЕТ МИГРАЦИОННУЮ И ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Н. Л. Овсянникова^{1,*}, А. В. Иванова¹, Т. У. Латыпова¹, С. В. Лаврушкина¹, И. И. Кирев¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: nat.ovs94@gmail.com

Частым следствием опухолевой прогрессии является трансформация морфологии ядер клеток. Так, изменение размера и деформация ядерной оболочки могут использоваться в прогностических целях.

Более того, способность к метастазированию может определяться ядерной ламинной (ЯЛ), сетью промежуточных филаментов, расположенной на внутренней ядерной мембране и отвечающей за механические свойства ядра. Причем ламин А, компонент ЯЛ, вносит наибольший вклад в жесткость ядра. При созревании белок теряет фарнезилированный С-конец в процессе протеолиза ZMPSTE24 и не заякоревается на ядерной мембране. Мутации, приводящие к накоплению фарнезилированного преламина А, ассоциированы с прогероидными синдромами и увеличением жесткости ткани. Важно, что для некоторых опухолей снижение экспрессии ламина А коррелирует с пролиферацией и большей эффективностью инвазии (Khan et al., 2018). При этом экспрессия фарнезилированных форм белка значительно снижает миграционную активность (Ovsiannikova et al., 2019).

Недавно была показана активность лопинавира как ингибитора ZMPSTE24 — его действие приводит к накоплению преламина А (Coffinier et al., 2008). Нами было предсказано, что батимастат и фозиноприл имеют более высокую ингибиторную активность.

Целью данной работы стало исследование, как накопление преламина А при действии батимастата и фозиноприла изменяет миграционную и пролиферативную активность клеток. Лопинавир использовали как контроль.

Мы выбрали линию фибросаркомы человека HT1080 как популярную для исследований подвижности. Миграционную активность оценивали в камерах Бойдена.

Наши результаты показывают, что фозиноприл значительно увеличивает уровень преламина А в клетках HT1080 и снижает миграцию через поры диаметром 3 мкм.

Мы предполагаем, что ингибирование активности ZMPSTE24 с помощью фозиноприла может рассматриваться как потенциальная стратегия терапии для борьбы с метастазированием.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-315-90069).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Coffinier C., Hudon S.E., Lee R., Farber E.A., Nobumori C., Miner J.H., Andres D.A., Spielmann H.P., Hrycyna C.A., Fong L.G., Young S.G. 2008. A potent HIV protease inhibitor, Darunavir, does not inhibit ZMPSTE24 or lead to an accumulation of Farnesyl-prelamin A in cells. *J. Biol. Chem.* V. 283. P. 9797.

Khan Z.S., Santos J.M., Hussain F. 2018. Aggressive prostate cancer cell nuclei have reduced stiffness. *Biomicrofluidics.* V. 12. P. 014102.

Ovsianikova N.L., Lavrushkina S.V., Yudina A.S., Strelkova O.S., Zhironkina O.A., Kireev I.I. 2019. The role of the nuclear lamina in cell migration: the connection with aging and metastasis. *Biopolym. Cell.* V. 35. P. 227.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА С ПОМОЩЬЮ БЕЛКА ARC/ARG3.1

А. Аль Осман^{1, *}, М. О. Дурыманов¹

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия

*E-mail: aya.alothman.95@mail.ru

Белок Arc/arg3.1 играет важную роль в различных типах пластичности нейронов, включая долговременную потенциацию и долговременное подавление. Выполнение этой функции белком Arc осуществляется за счет его способности регулировать эндоцитоз рецепторов и организовывать актиновый цитоскелет в области дендритных шипиков нейронов, образующих синапсы. Кроме того, ретровирусный/ретротранспозонный GAG-подобный домен в Arc/Arg3.1 образует вирусоподобные капсиды, которые компактизируют и транспортируют свою мРНК в составе внеклеточных везикул в соседние клетки, обеспечивая обмен информацией между нейронами (Pastuzyn et al., 2018). Способность этих капсидов преодолевать внутриклеточные барьеры и переносить мРНК в клетки-мишени делает этот белок перспективным кандидатом для создания векторов для генной терапии (Kedrov et al., 2019). Поскольку Arc является эндогенным белком человека, потенциальное использование Arc в качестве носителя не приведет к появлению иммунного ответа и нежелательным побочным эффектам. Принимая во внимание эти свойства белка Arc, мы планируем оценить возможность его использования для доставки нуклеиновых кислот в различные типы клеток млекопитающих. Кроме того, известно, что раковые клетки глиом способны обмениваться информацией через перенос онкогенных молекул во внеклеточных везикулах (Kucharzewska et al., 2013). Таким образом, нами была выдвинута гипотеза, что белок Arc может экспрессироваться в данных клетках и принимать участие в процессах передачи мРНК между ними.

В ходе этой работы мы проверили экспрессию Arc в клеточных линиях глиобластомы (U87, U251, LN229) и клетках первичной культуры из опухоли глиобластомы. Оказалось, что во всех этих клетках белок Arc экспрессирован. Методом иммуноблоттинга нами впервые было показано, что белок Arc присутствует в экзосомах, полученных из клеток U87, выделенных ультрацентрифугированием. Экзосомы, выделенные из U87, экспрессирующие Arc-GFP (лентивирусная трансдукция), использовали для трансфекции клеток-реципиентов U87. Спустя 30 ч было обнаружено несколько клеток-реципиентов, экспрессирующих Arc-GFP, что указывает на способность Arc-содержащих экзосом переносить свою мРНК между клетками глиомы. Кроме того, мы изучили кинетику взаимодействий РНК–белок с использованием ВЛ-кинетического метода на основе стрептавидина и оценили константу равновесной диссоциации (KD) между рекомбинантным белком Arc и его собственной мРНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Pastuzyn E.D. et al. 2018. The neuronal gene Arc encodes a repurposed retrotransposon gag protein that mediates intercellular RNA transfer. *Cell.* V. 172. P. 275.

Kedrov A.V., Durymanov M., Anokhin K.V. 2019. The Arc gene: Retroviral heritage in cognitive functions. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* V. 99. P. 275.

Kucharzewska P. et al. 2013. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. Proceedings of the National Academy of Sciences. V. 110. P. 7312.

ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ НА КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ ПЕРВИЧНЫХ И РЕЦИДИВИРУЮЩИХ ГЛИОМ ЧЕЛОВЕКА

С. А. Павлова^{1,*}, Е. А. Савченко², А. В. Голанов², И. Н. Пронин², Г. В. Павлова^{1,2}

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

²ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, Россия

*E-mail: pavlova.sweti@yandex.ru

Глиомы III–IV Grade являются одними из наиболее агрессивных злокачественных новообразований нервной системы и отличаются низкой выживаемостью пациентов и высоким риском рецидива. На данный момент основным видом терапии глиом является хирургическое удаление опухоли с последующей химио- и лучевой терапией. Однако, вследствие инвазии и миграции опухолевых клеток в окружающие ткани, в дальнейшем может происходить повторный рост опухоли и рецидив заболевания. Существует предположение, что опухоли, развивающиеся у пациентов, прошедших лучевую и химиотерапию, обладают большей устойчивостью к повторной терапии, по сравнению с первичными опухолями (Ghosh et al. 2018).

В данной работе было исследовано влияние облучения на 4 культуры III–IV Grade, полученные из первичных опухолей, и 4 культуры III–IV Grade, полученные из рецидивирующих опухолей. Культуры подвергались однократному облучению дозой 20 Гр на цифровом линейном ускорителе TrueBeam и на 7 день после этого проводилась оценка пролиферативной активности культур, миграционной активности и их жизнеспособности.

Оценка пролиферативной активности проводилась методом MTS теста, в ходе которого было выявлено, что клеточные культуры, полученные из рецидивирующих опухолей, обладают большей устойчивостью к облучению, и уровень их пролиферативной активности составляет 91–129% от необлученного контроля, в то время как в первичных культурах этот уровень составлял 45–69% от контроля.

Оценка миграционной активности проводилась с помощью transwell-системы, и уровень миграционной активности клеточных культур из первичных опухолей составлял 13–75% от контроля, а из рецидивов опухоли – 5–177% от контроля.

Оценка жизнеспособности клеточных культур проводилась методом проточной цитофлуориметрии. Доля живых клеток от необлученного контроля составляла 68–97% и 42–82% для культур первичных опухолей и культур рецидивов соответственно. Для апоптотических клеток эти показатели составляли 475–7104% и 59–1435%, а для некротических клеток 81–1848% и 179–1151% соответственно.

Таким образом, было показано, что в целом, клеточные культуры, полученные из рецидивов опухолей, обладают большей устойчивостью к дальнейшей терапии. Кроме того, в некоторых из этих культур после облучения наблюдается усиление пролиферации и миграционной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (проект № 075-15-2020-809 (13.1902.21.0030)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ghosh D., Nandi S., Bhattacharjee S. 2018. Combination therapy to checkmate Glioblastoma: clinical challenges and advances. Clin. Trans. Med. V. 7: e33.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH И ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RUNX2 В МОДЕЛИ ИХ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ В ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ

Д. Д. Паншин^{1,*}, А. А. Лобов¹, А. Б. Малашичева¹

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

*E-mail: panshin@killas.ru

Внутриклеточный домен NOTCH и фактор транскрипции RUNX2 – это одни из ключевых транскрипционных факторов остеогенеза. Однако если RUNX2 является необходимым для активации программы остеогенной дифференцировки и делеции по нему приводят к реформированию костей, роль NOTCH в остеогенезе

незе остается неоднозначной. Мы предполагаем, что сигнальный путь NOTCH может дозозависимо регулировать экспрессию *RUNX2*.

Чтобы проверить эту гипотезу мы оценили эффект гиперэкспрессии *RUNX2* и внутриклеточного домена *NOTCH1* на экспрессию генов, связанных с этими сигнальными каскадами. Процессы, регулируемые сигнальными путями Notch и *RUNX2*, в значительной степени перекрываются, но прямая связь между этими сигнальными путями еще не продемонстрирована. Чтобы проверить это, мы исследовали влияние сверхэкспрессии *RUNX2* и внутриклеточного домена NOTCH на экспрессию генов, связанных с этими сигнальными каскадами.

Для экспериментов мы использовали две иммортализованные клеточные линии – HeLa и HEK293T. Мы провели трансфекцию клеток плазидами, несущими полноразмерный транскрипт *RUNX2* и последовательность, соответствующую внутриклеточному домену *NOTCH1* (*NIICD*), после чего выделили РНК и оценили уровень экспрессии *RUNX2* и *NOTCH*, а также их генов-мишеней при помощи ПЦР в реальном времени. Также из этих клеток был выделен белок и проведен “скорострельный” протеомный анализ.

Активация *RUNX2* в клетках HeLa и HEK-293T приводила к повышенной экспрессии компонентов сигнального пути Notch (*NOTCH1* и *NOTCH2*), а также гена-мишени Notch (*HES1*), что указывает на активацию этого сигнального пути при сверхэкспрессии *RUNX2*. Аналогичные данные были получены в результате протеомного анализа. Нам удалось идентифицировать 3471 белок, при этом *RUNX2* был обнаружен во всех экспериментальных образцах, трансфицированных конструкциями *NIICD* и *RUNX2*, но не в контрольных клетках HeLa. Примечательно, что уровень *RUNX2* в клетках, трансфицированных обеими плазидами, был значительно ниже, чем при трансфекции одной конструкцией *RUNX2*. Можно предположить, что активация *NOTCH* усиливает экспрессию *RUNX2*, но в то же время не позволяет ей подняться выше определенного уровня.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-14-00152-П).

ПЕРОКСИД ВОДОРОДА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПОСРЕДНИК “ЭФФЕКТА СВИДЕТЕЛЯ” ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Н. Н. Пескова^{1, *}, А. А. Горохова¹, Ю. С. Бугрова¹, И. В. Балалаева¹

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*E-mail: nin-22@yandex.ru

Фотодинамическая терапия – метод диагностики и лечения злокачественных новообразований, основанный на избирательном накоплении в опухолевой ткани фотосенсибилизатора (ФС), способного при локальном воздействии света с длиной волны, соответствующей его максимуму поглощения, генерировать цитотоксические агенты, вызывающие гибель опухолевых клеток. Для увеличения эффективности ФД-эффекта на опухоль представляет интерес изучение такого явления, как “эффект свидетеля” – распространение ответа от облученных клеток к соседним, не затронутым воздействием. Перспективной сигнальной молекулой для “эффекта свидетеля” считается H_2O_2 , который продуцируется в результате ФД-воздействия и может запускать сигнальные каскады в клетках.

Цель данной работы – анализ участия H_2O_2 в передаче сигнала от облученной клетки к соседним, не затронутым воздействием, после ФД-воздействия.

Исследования проводились на стабильно трансфицированных клеточных линиях эпидермоидной карциномы человека A431 с экспрессией генетически кодируемого сенсора *NuPer* в цитоплазме и митохондриях клеток. Поскольку *NuPer* чувствителен к содержанию H_2O_2 за счет изменения спектра возбуждения флуоресценции, в работе был использован ратиометрический метод определения его концентрации. В качестве параметра, характеризующего содержание H_2O_2 , нами определялось отношение регистрируемого сигнала флуоресценции *NuPer* при разных длинах волн возбуждения (I_{488}/I_{405}). В качестве ФС использовалось клинически одобренное гидрофильное соединение Фотосенс® (ФГУП ГНЦ НИОПИК, Россия) с внутриклеточной локализацией в лизосомах.

В исследовании был использован подход, при котором световому воздействию подвергалась только единичная клетка или ее часть (примерно 1/2), что позволило использовать необлученную часть в качестве контроля для определения эффекта свидетеля и возможной передачи сигнала между клетками. ФД-воздействие в дозах 50–150 Дж/см² осуществлялось через объектив микроскопа с использованием лазера, соответствующего спектру поглощения ФС (633 нм), а общее время облучения не превышало 1 минуты.

Показано, что локальное ФД-воздействие приводило к последовательному ответу клеток от облученной к отдаленным. Количественная оценка наблюдаемых изменений показала, вероятность передачи сигнала от клетки-мишени к свидетелям увеличивается при наличии физического контакта клеток. Присутствие в среде инкубации фермента каталазы не препятствовало развитию ответа облученной клетки, однако в таких условиях распространения сигнала к соседним клеткам не происходило, что согласуется с литературными данными о возможной роли H_2O_2 как сигнального посредника.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 0729-2020-0061), а также при поддержке Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Н.Н. Пескова благодарит за персональную поддержку в форме стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам (СП-2067.2021.4).

РОЛЬ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В ПРОГРЕССИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

М. В. Попов^{1,*}, А. А. Филин², В. В. Шишкина³

¹ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, кафедра патологической анатомии, Воронеж, Россия

²Научно-исследовательский институт экспериментальной биологии и медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: kilo199877@mail.ru

Колоректальный рак (КРР) является одним из самых часто диагностируемых злокачественных новообразований в мире. При этом роль опухоль-инфильтрирующих иммуноцитов и воспалительного микроокружения при КРР неоднозначна. Тучные клетки (ТК) обнаруживаются в различных опухолях и являются одними из основных клеток опухолевого микроокружения. Им отводят роль в активации ангиогенеза, опухолевой прогрессии, участие в контроле противоопухолевого иммунного ответа. Однако роль ТК в морфогенезе рака толстого кишечника до конца не определена.

Материалы и методы. Материал 46 пациентов, прооперированных по поводу колоректального рака, структурирован по полу, возрасту, продолжительности жизни после постановки диагноза, размеру опухоли, глубине ее прорастания, наличию или отсутствию метастазов в регионарные лимфатические узлы, гистологическому типу опухоли и степени ее дифференцировки. Помимо обзорной применялось ИГХ с мышинными моноклональными антителами к химазе и триптазе ТК. Производился количественный подсчет химаза- и триптаза-позитивных ТК в опухоли и в инвазивном крае, определялась степень их дегрануляции.

Результаты. ТК были обнаружены во всех исследованных случаях, причем триптаза-позитивные тучные клетки встречались почти в 2 раза чаще, чем химаза-позитивные (в среднем 6.01 ± 0.7 и 3.4 ± 0.5 клеток в поле зрения соответственно). Наибольшее число ТК наблюдалась в инвазивном крае опухоли, в самой же опухоли встречаемость ТК была низкой, обнаруживались только единичные клетки. При сравнении среднего числа ТК в опухоли и ее инвазивном крае у пациентов с разной выживаемостью (ранняя смерть, в течение 1 года и пациенты прожившие 5 лет и более) не было выявлено никаких закономерностей. Также наблюдалось отсутствие каких-либо корреляций между числом ТК и наличием/отсутствием регионарных метастазов. Единственная закономерность, выявленная в ходе работы, заключалась в том, что при снижении степени дифференцировки опухоли наблюдалось снижение среднего числа химаза- и триптаза-позитивных ТК как в самой опухоли, так и в ее инвазивном крае.

Помимо количественного подхода к оценке ТК была изучена активность ТК, которую оценивали по индексу дегрануляции. Полученные данные показали, что наиболее активные ТК встречались как раз в самой опухоли, несмотря на их малое количество. В инвазивном крае активность ТК была выражена слабее, хотя количественно они могли многократно преобладать.

Заключение. При колоректальном раке ТК широко представлены в микроокружении опухоли. ТК в опухоли распределяются неравномерно и количественно преобладают в инвазивном крае опухоли, при этом дегрануляция ТК активно происходит в самой опухоли, а не в инвазивном крае. Дальнейшее изучение роли ТК в морфогенезе КРР следует проводить с учетом их активности, а не количественных показателей, а также с учетом взаимодействия с другими клеточными элементами микроокружения.

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ И ИНВАЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ БИОМЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

А. Д. Поспелов^{1,*}, С. Д. Гефтер¹, Д. Б. Трушина^{2,3}, Ю. М. Ефремов², И. В. Балалаева¹

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

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

³ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

*E-mail: eso103163@gmail.com

Децеллюляризованные матриксы предоставляют собой новую платформу для создания трехмерных опухолевых моделей *in vitro*. Децеллюляризация представляет собой процесс получения внеклеточного матрикса за счет удаления клеток из органов или тканей с сохранением нативной архитектоники и биомеханических свойств. Использование в качестве источника матрикса как нормальных, так и опухолевых тканей животных и человека позволяет изучать влияние физических и химических свойств матрикса на процессы метастазирования, развития устойчивости опухоли к препаратам, выявлять особенности опухоль-организменного взаимодействия.

Целью этой работы являлось определение биомеханических свойств ДЦЛ матриксов ряда органов мыши и поиск их взаимосвязи с морфологией и инвазивной активностью опухолевых клеток.

Для получения матриксов органы последовательно выдерживались в децеллюляризирующих средах с поверхностно-активными веществами (SDS, SDC и Triton X-100). Полученные матриксы заселялись опухолевыми клетками рака молочной железы человека линий SKBR-3 и MDA-MB-231, которые распределялись внутри матрикса методом прямого вкола. Кроме этого, использовали искусственные матриксы на основе коллагена. Для анализа архитектоники матрикса была использована сканирующая электронная микроскопия (HitachiTM 4000Plus). При определении биомеханических свойств применяли такие методы как реологическое исследование (Physica MCR 302), макроиндентацию (Mach-1TM v500csst) и наноиндентацию (Bioscope Resolve microscope). Для определения степени репопуляции был проведен стандартный гистоморфологический анализ, а также определение концентрации ДНК.

Матриксы разных органов отличались как по размеру пор, так и по своим жесткостным характеристикам. Полученные результаты продемонстрировали, что в матриксах легких и почек, обладающих средней жесткостью и наибольшим размером пор, было обнаружено наибольшее количество опухолевых клеток. Клетки линии MDA-MB-231 показали выраженную мезенхимальную морфологию и высокую степень инвазии, в то время как клетки линии SKBR-3 формировали объемные локальные кластеры. Напротив, в матриксах с более низкой жесткостью и мелкой пористостью, таких как селезенка, печень или коллаген, все обнаруженные клетки имели более эпителиальный фенотип, а их количество было довольно мало. При этом показана тенденция к росту более эпителиальной линии SKBR-3 в жестких матриксах, в то время как более мезенхимальная линия MDA-MB-231 продемонстрировала склонность к активной пролиферации в матриксах с меньшей жесткостью. В дальнейшем развитие опухолевой модели на основе ДЦЛ матриксов позволит более детально изучить механизмы, лежащие в основе метастазирования и формирования опухолевого микроокружения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проекты № 19-74-20168 и № 21-74-10058), а также при поддержке Программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

АКТИВАЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА – ТРЕТЬЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ПЛАТФОРМА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ТЕХНОЛОГИИ “КАРАНАХАН”

В. С. Рузанова^{1,2,*}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

*E-mail: v.ruzanova.s@yandex.ru

В лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН была разработана новая технология лечения онкологических заболеваний “Каранахан” (“убивающий причину”, санскрит), основанная на эрадикации стволовых опухолевых клеток и индукции апоптоза коммитированных опухолевых клеток. При применении технологии определяется индивидуальный для каждой опухоли временной режим обработок кросслинкующим цитостатиком и сложнокпозиционным препаратом ДНК, привязанных к репаративному и клеточному циклам. В настоящей работе на модели мышинной карциномы легкого Льюиса техно-

логия “Каранахан” показала высокую терапевтическую противоопухолевую эффективность в четырех независимых экспериментах, выполненных в различные сезоны и в два следующих один за другим года, в двух вариантах: с прививкой трансплантата в одну или две лапы. В наиболее показательных экспериментах удалось достичь вылечения 70% (в случае с одной опухолью) и 60% (в случае с двумя опухолями) экспериментальных животных. Проведенные в разные сезоны года и в течение двух календарных лет однотипные эксперименты выявили зависимость эффективности примененной терапии от календарных факторов. Также было установлено, что технология “Каранахан” активирует противоопухолевый иммунный ответ. Происходит увеличение численности популяций T-kill в селезенке; NK-клеток в крови и селезенке; T-help в опухоли и селезенке. В опухоли появляется достоверно высокое количество активированных дендритных клеток. Полностью элиминируются Foxp3+ T-регуляторные клетки, за счет чего снижается супрессорная активность опухоль-ассоциированной стромы. Установлено, что в клетках опухоль-ассоциированной стромы в результате проведенных обработок увеличивается экспрессия противоопухолевого фактора NO-синтазы 2 (NOS2) и уменьшается экспрессия проопухолевых цитокинов IL-10 и TGFβ1. Этот факт свидетельствует о реполяризации опухоль-ассоциированных макрофагов с M2 проопухолевого фенотипа на M1/M0 противоопухолевый фенотип. Таким образом, в исследовании на модели мышинной карциномы легкого Льюиса была показана противоопухолевая эффективность технологии “Каранахан”. Установлено, что при применении данной технологии активируется противоопухолевый иммунный ответ как третий эффекторный терапевтический вектор, наряду с эрадикацией стволовых опухолевых клеток и индукцией масштабного апоптоза коммитированных опухолевых клеток. В совокупности применение технологии создает условия для вылечения экспериментальных животных.

КЛЕТКИ СТРОМАЛЬНЫХ И ПРОИЗВОДНЫХ ОРГАНОИДНЫХ КУЛЬТУР ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ЭКСПРЕССИРУЮТ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ И ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ

В. М. Рябов¹, М. М. Барышев², М. А. Воскресенский³, Б. В. Попов^{1,*}

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

²*Институт микробиологии и вирусологии, Рижский университет им. Страдиньша, Рига, Латвия*

³*Городская многопрофильная больница № 2 МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: borisvp478@gmail.com*

Стромальные клетки ткани предстательной железы (СКПЖ) ранних пассажей и производных органоидных культур (ОК) экспрессируют тканеспецифические эпителиальные и опухолевые маркеры и являются перспективной преคลินิกической моделью в изучении патогенеза, поиске новых маркеров для диагностики и прогноза заболевания, а также средств для терапии рака предстательной железы (РПЖ). Наша цель заключалась в получении стромальных клеток и соответствующих им ОК из опухолевой и нормальной ткани предстательной железы (ПЖ) человека и проведении маркерного анализа на экспрессию опухолевых и эпителиальных маркеров ПЖ. Клеточные суспензии, полученные из образцов ткани ПЖ пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу РПЖ, были использованы для приготовления стромальных (СКПЖ) и ОК. Рост стромальных и ОК культур оценивали с помощью микроскопии в проходящем свете, а экспрессию эпителиальных, мезенхимных и опухолевых маркеров — путем полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), клонирования и секвенирования ПЦР-продуктов и иммунофлюоресценции.

В результате выполненной работы мы обнаружили, что ОК могут быть приготовлены из СКПЖ, подразделенных нами на ранние (пассажи 1–3), и поздние (пассажи 4–6). Используя полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) мы нашли, что клетки ранних и поздних СКПЖ, и соответствующие ОК, экспрессируют эпителиальные маркеры, продукция которых снижается или исчезает в поздних СКПЖ и производных ОК. СКПЖ ранних пассажей и соответствующие ОК, полученные из опухолевой ткани, продуцируют также маркер РПЖ *AMACR*, а в половине из них выявляется рекомбинантный маркер РПЖ *TMPRSS2-ERG*. Такой рекомбинантный мутантный ген идентифицирован нами путем клонирования и секвенирования продуктов ОТ-ПЦР, полученных из опухолевой ткани ПЖ, производных ранних СКПЖ и соответствующих ОК. В опухолевой ткани соответствующих ранних СКПЖ и ОК нами также выявлена путем ОТ-ПЦР, электрофореза белков и иммуноблотинга со специфическими антителами повышенная продукция белка EZH2.

Полученные результаты предполагают, что ранние пассажи СКПЖ и соответствующие ОК представляют собой перспективную преคลินิกическую модель для поиска ранних маркеров агрессивной формы РПЖ.

Работа выполнена в рамках бюджетной темы Института цитологии РАН № 0124-2019-0004.

АКТИВАЦИЯ АВС-ТРАНСПОРТЕР-ОПОСРЕДОВАННЫХ МЕХАНИЗМОВ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НСТ116

А. В. Сагайдак^{1,*}, Я. А. Григорьев¹, А. Д. Зенина¹

¹Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: aleksandrasagaidak@yandex.ru

Онкологические заболевания выходят на второе место по смертности населения по всему миру. Данная тенденция, в частности, связана с развитием резистентности опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам различного механизма действия. Одной из причин развития множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) является гиперактивность трансмембранных белков-транспортёров семейства АВС – Р-гликопротеина (Pgp) и белка устойчивости рака молочной железы (BCRP), что приводит к выбросу лекарственных препаратов из клеток и снижению эффективности лечения.

Изучение формирования резистентности онкологических клеток к различным противоопухолевым препаратам является необходимым для создания лекарственных препаратов, способных снижать активность транспортёров и преодолевать устойчивость клеток.

Целью работы являлось создание клеточных линий с АВС-транспортёр-опосредованной устойчивостью, изучение их свойств и выявление предпосылок для ее формирования. Для этого использовали 2 подхода: а) селекцию клеток по принципу нечувствительности к препарату, б) отбор клеток с изначально пониженным накоплением флуоресцентного субстрата.

Изучение полученных клеток подразумевало определение транспортной активности АВС-белков по степени накопления клетками красителей родамина 123 (прижизненного митохондриального красителя, субстрата Pgp) и Хекста 33342 (интеркалирующего ядерного красителя, субстрата Pgp и BCRP) с использованием ингибиторов транспортёров различной селективности – тариквидара (ингибитор Pgp) и ортованадата натрия (ингибитор обоих транспортёров). При этом использовали систему высокосолевого анализа Operetta и планшетный ридер CLARIOstar.

В случае использования цитотоксических агентов для отбора клеток, красители использовали только для количественной оценки свойств; при втором подходе именно накопление родамина использовали в качестве критерия для отбора. Для оценки изменения уровней экспрессии генов белков-транспортёров использовали метод ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ).

В работе использовали клетки аденокарциномы толстой кишки человека (НСТ116). При отборе клеток, нечувствительных к препарату (таксолу) концентрацию препарата ступенчато увеличивали по мере адаптации клеток, начиная с 0.01 мкМ. Было получено 8 поколений, последнее из которых успешно культивируется при концентрации 1.92 мкМ. Для отбора клеток, которым свойственно пониженное накопление субстратов транспортёров, их окрашивали родамином 123 (0.5 мкМ) и выделяли популяцию с наименьшей светимостью при помощи BioRad S3e Cell sorter.

Полученные штаммы характеризуются увеличением транспортной активности Pgp и BCRP, а также активацией экспрессии соответствующих генов. Они успешно используются для изучения активности препаратов-кандидатов для терапии химиорезистентных опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 19-73-10150).

СВЯЗЬ NF-κB И VAX С ВОСПАЛЕНИЕМ ПЕЧЕНИ У БОЛЬНЫХ ОЖИРЕНИЕМ И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Л. А. Сафиуллина¹, А. А. Комар^{1,*}, Д. А. Шунькина¹, М. А. Вульф¹, Г. Л. Кузнецов², Л. С. Литвинова¹

¹Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Центр иммунологии и клеточных биотехнологий,
Калининград, Россия

²Областная клиническая больница Калининградской области, второе хирургическое отделение,
Калининград, Россия

*E-mail: alexandkomar@gmail.com

Одним из распространенных последствий ожирения является развитие стеатоза печени и стеатогепатита. Несмотря на всестороннюю изученность этиологических и патогенетических аспектов вышеуказанных заболеваний печени, установление механизмов их развития до сих пор остается актуальным. В связи с этим, целью работы явилась оценка вклада проапоптотического гена VAX и компонентов пути NF-κB в воспаление печени при ожирении и сахарном диабете 2 типа (СД 2 типа). В исследование были включены 183 пациента с ожирением, из

которых 104 имели СД 2 типа. Группу контроля составили 42 здоровых донора, сопоставимые по возрастным и гендерным признакам. Для оценки наличия признаков воспаления и его степени был проведен гистологический анализ ткани печени с подсчетом количества лимфоцитов. Уровни экспрессии генов *NF-κβ1* и *VAX* в ткани печени были оценены методом ПЦР в реальном времени, а измерение полуколичественного содержания белков *NF-κβ/p65* и *VAX* в печени – методом Вестерн-блота. Все данные были обработаны с помощью программы GraphPad Prism 9.0. Выявлено, что у больных морбидным ожирением количество лимфоцитов в ткани печени было значимо ниже аналогичных значений больных ожирением с ИМТ < 40 кг/м² и больных с СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м². Нами обнаружено, что уровни экспрессии генов *NF-κβ1* (компонент канонического сигнального пути) и *VAX* были снижены у больных ожирением с СД 2 типа и без него с ИМТ > 40 кг/м² в сравнении с контролем. Напротив, содержание в ткани печени белков *NF-κβ/p65* (компонент неканонического сигнального пути) у всех больных ожирением и *VAX* – только у больных СД 2 типа было выше относительно контроля. Интересен факт, что у пациентов без СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м² количество лимфоцитов, идентифицируемое в ткани печени, отрицательно коррелировало с уровнем экспрессии проапоптотического гена *VAX* в печени ($r = -0.50$, $p < 0.05$). Также у пациентов с СД 2 типа и без него (ИМТ > 40 кг/м²) были выявлены взаимосвязи между экспрессией генов *VAX* и *NF-κβ1* ($r = 0.80$ и $r = 0.73$, $p < 0.05$ соответственно). Резюмируя вышесказанное, стоит заключить, что в печени при морбидном ожирении снижается активность канонического пути активации *NF-κβ*. При этом у больных без СД 2 типа увеличивается активность неканонического пути *NF-κβ*, что сопряжено с более низкими (чем у больных СД 2 типа) значениями числа лимфоцитов, инфильтрирующих ткань печени. Мы предполагаем, при морбидном ожирении без СД 2 типа переключение активации *NF-κβ* с канонического на неканонический путь, а также снижение уровня экспрессии проапоптотического гена *VAX* в целом, способствуют снижению прогрессии стеатоза и воспаления в печени у больных неалкогольной жировой болезнью печени.

Исследование выполнено при финансовой поддержке государственного задания (№ FZWM-2020-0010).

РОЛЬ ZEB1 В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ МАКРОФАГОВ НА ПРИМЕРЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ THP-1

О. М. Семёнов^{1,*}, А. А. Дакс¹, Н. А. Барлев^{1,2}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

*E-mail: semyonov.somspb@yandex.ru

Zeb1 (Z-finger homeobox, 1) является одним из транскрипционных факторов, регулирующих эпителиально-мезенхимный переход (ЭМП) – процесс, играющий ключевую роль в развитии раковых опухолей. Zeb1 способствует потере эпителиальными клетками адгезионных контактов, приобретению способности к миграции и инвазии, что, в конечном итоге, приводит к их распространению по организму и формированию метастаз. Данный транскрипционный фактор активирует и репрессирует транскрипцию большого числа генов, участвующих в различных процессах. Таким образом, роль Zeb1 проявляется не только в ЭМП. Так, он участвует в дифференцировке иммунных клеток различных типов, регуляции хемотаксиса и воспаления.

Нами было показано влияние статуса Zeb1 на процесс дифференцировки моноцитов в макрофаги на линии клеток острого моноцитарного лейкоза человека, THP-1. С помощью лентивирусной трансдукции были получены клетки, несущие стабильный нокдаун гена, кодирующего Zeb1. Наличие нокдауна было подтверждено методом иммуноблоттинга и ОТ-ПЦР. Для дифференцировки THP-1 в макрофаги, клетки выдерживали 48 ч в среде, содержащей форбол-12-миристат-13-ацетат в концентрации 10 нг/мл, после чего производилась смена среды и культивирование еще в течение 48 ч. С помощью ОТ-ПЦР было произведено сравнение экспрессии генов, кодирующих характерные маркеры моноцитов и макрофагов.

В результате было выявлено, что клетки с нокдауном Zeb1 после дифференцировки значительно интенсивнее экспрессировали моноцитарный маркер (CD64) по сравнению с Zeb1-положительными клетками. Экспрессия маркеров, характерных для макрофагов CD11b и CD68, не зависела от статуса Zeb1. Помимо этого, было выявлено, что экспрессия *TNF-α*, маркера провоспалительной активации макрофагов, была значительно снижена в клетках, негативных по Zeb1.

Таким образом Zeb1 необходим для формирования макрофагов и их участия в воспалительных процессах.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.) для ИБМХ.

МОДУЛЯЦИЯ ОТВЕТА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ДЕПРИВАЦИИ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ ПРИ ПЕРЕХОДЕ К ТРЕХМЕРНОМУ КУЛЬТИВИРОВАНИЮ

Л. М. Сенча^{1, *}, О. Е. Добрынина¹, А. Д. Поспелов¹, И. В. Балалаева¹

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*E-mail: luda-sencha@mail.ru

Взаимодействие опухолевых клеток с матриксом может приводить к модуляции большого количества внутриклеточных сигнальных путей. Эти изменения могут приводить к формированию фенотипа клеток, обеспечивающего их существование и пролиферацию в особых условиях опухолевого микроокружения, а также резистентности клеток к воздействию цитотоксических соединений. Коллаген является основным компонентом микроокружения опухоли и может влиять на поведение опухолевых клеток через интегрины и другие виды рецепторов. Целью данной работы являлся сравнительный анализ устойчивости опухолевых клеток к дефициту питательных веществ и гипоксии, а также к действию терапевтических агентов при культивировании клеток в монослое и коллагеновом гидрогеле.

Работа была выполнена на клетках карциномы яичника человека SKOVip-kat и клетках эпидермоидной карциномы человека A431-GFP, обе линии клеток экспрессируют флуоресцентные белки. Была проанализирована динамика роста 2D и 3D-культур в условиях питательной депривации (культуральная среда без FBS/глюкозы) и гипоксии (1% O₂). Определение жизнеспособности клеток в монослойной культуре осуществляли с помощью МТТ-теста. В случае коллагеновых гидрогелей использовали подход, основанный на регистрации интегральной флуоресценции гелей без их разрушения. Было также проведено сравнительное исследование устойчивости опухолевых клеток, культивируемых в монослое и коллагеновом гидрогеле, к действию цисплатина и противоопухолевого таргетного токсина DARPIn-LoPE.

Полученные результаты показали, что клетки A-431-GFP в составе гидрогеля обладают большей устойчивостью к действию сывороточной и глюкозной депривации по сравнению с клетками данной линии в монослое. Для линии SKOVip-kat, наоборот, характерно понижение устойчивости клеток к сывороточной депривации при переходе от 2D к 3D культивированию, в то время как к воздействию глюкозной депривации данные клетки демонстрируют относительную нечувствительность. Анализ действия гипоксии на клетки, выращиваемые в гидрогелях, показал усиление чувствительности к действию данного фактора для линии клеток A-431-GFP, в то время как для SKOVip-kat характерна относительная нечувствительность к действию кислородной депривации. Культивирование клеток в гидрогеле также привело к повышению устойчивости опухолевых клеток к цисплатину и белковому токсину.

Таким образом, показано, что способ культивирования может изменять чувствительность опухолевых клеток к депривации и действию противоопухолевых агентов, причем изменение чувствительности зависит как от морфофункциональных особенностей клеток, так и от вида воздействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-20168).

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ ПАНЕЛИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ МАРКЕРОВ КЛЕТОЧНОГО СТРЕССА MICA И MICB

А. Ю. Столбовая^{1, 2, 3}, И. В. Смирнов^{1, 2}, И. В. Грязева¹, И. Ю. Крутецкая¹, Л. А. Терехина¹, И. С. Малахов¹, О. А. Шашкова^{1, 2}, А. А. Пиневиц^{1, 4}, Н. Л. Варганян¹, М. П. Самойлович^{1, 4}

¹Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова, Санкт-Петербург, Россия

²Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: anastasia.stolbovaya@gmail.com

Маркеры клеточного стресса MICA и MICB, родственные белками MHC I класса, появляются на мембране инфицированных, поврежденных или трансформированных клеток. Оба белка взаимодействуют с рецепторами NKG2D на мембране НК-клеток, проявляющих цитотоксические свойства в ответ на связывание.

Злокачественная трансформация клеток приводит к усилению экспрессии белков MICA и/или MICB. Опухоли могут служить источником растворимых форм этих белков, которые, связываясь с рецептором

NKG2D, вызывают десенситизацию NK-клеток. Развитие злокачественных новообразований органов пищеварительной и кровеносной систем, а также кожи сопровождается повышением концентрации растворимых форм MICA и MICB в крови пациентов. Увеличения уровня этих белков рассматривают как индикатор избегания опухолью иммунного надзора, что подтверждается отрицательной корреляцией их уровней и выживаемости пациентов. В экспериментах на животных показано, что введение антител, подавляющих шеддинг MICA/B белков клетками опухолей, приводит к ослаблению метастазирования.

Цель работы – создание и иммунохимическая характеристика моноклональных антител, связывающих растворимые и мембранные формы MICA и/или MICB.

Мышей F1 (DBAхBalb/c) иммунизировали рекомбинантными экстраклеточными фрагментами белков MICA или MICB. Гибридизацию спленоцитов мыши проводили с клетками миеломы Sp2/0. Выявление специфичных антител в ростовых средах гибридом проводили методом иммуноферментного анализа с использованием адсорбированных на твердую фазу белков MICA или MICB, либо фиксированных клеток С6, несущих MICA или MICB на мембране.

Создано 10 штаммов гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к MICA (5 антител) и MICB (5 антител). Три антитела распознают только MICA и одно антитело связывает только MICB, остальные реагенты демонстрируют перекрестную реактивность.

С помощью иммуноферментного анализа показано, что тепловая денатурация антигенов не влияла на связывание антител с ними, тогда как восстановление дисульфидных связей в молекулах антигена снижало аффинитет взаимодействия трех антител к MICA и пяти антител к MICB. Два антитела к MICA направлены против линейных эпитопов, тогда как остальные реагенты связывают конформационные эпитопы.

Взаимное пространственное расположение эпитопов, распознаваемых антителами, на молекулах белков MICA или MICB определяли методом конкурентного иммуноферментного анализа. Установлено, что четыре антитела связывают изолированные детерминанты, тогда как остальные шесть антител взаимодействуют с частично перекрывающимися эпитопами.

Для выявления растворимых форм MICA и MICB с помощью двуцентрового ИФА провели подбор комплементарных пар антител, позволяющих специфично и с высокой чувствительностью выявлять эти антигены в растворе.

Созданная панель моноклональных антител используется для разработки систем выявления MICA и MICB на гистологических срезах и определения концентраций их растворимых форм в биологических жидкостях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-15-00021).

ОВЕРЭКСПРЕССИЯ H-RAS ПРИВОДИТ К РАЗВИТИЮ ОНКОГЕН-ИНДУЦИРОВАННОГО СТАРЕНИЯ В ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

А. Л. Торопов¹*, П. И. Дерябин¹, А. В. Бородкина¹

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

**E-mail: toropov.01@bk.ru*

На данный момент существуют убедительные доказательства наличия взаимосвязи между накоплением стареющих клеток, дисфункцией тканей и прогрессией разнообразных патологий. Клеточное старение может быть вызвано различными стимулами, такими как укорочение теломер, стрессовые воздействия, потеря онкосупрессоров или активация онкогенов. Хотя повышенная экспрессия онкогенов может стимулировать пролиферацию клеток, что признано необходимым шагом в онкогенезе при многих типах рака, она может действовать как генетический стресс и вызывать необратимый арест роста в культивируемых клетках и опухолевых тканях. Это явление называют “онкоген-индуцированным старением”, и оно является врожденным защитным механизмом от прогрессии рака, однако часто его эффективность снижается из-за дальнейших мутаций.

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что повышенная экспрессия онкогена H-Ras может приводить к развитию характерного для стареющих клеток фенотипа. Но исследования последних лет указывают, что появление Ras-индуцированного старения сильно зависит от клеточного типа, а также от уровня экспрессии активированного Ras. При этом, реакция на сверхэкспрессию H-Ras эндометриальных стромальных клеток человека до сих пор не была описана. В связи с этим, цель настоящего исследования состоит в характеристике эндометриальных стромальных клеток человека (эСК) с сверхэкспрессией H-Ras.

В данной работе эСК (2804) были модифицированы с помощью лентивирусной системы набором из двух векторов: один из них содержал последовательности, кодирующие зеленый флуоресцентный белок GFP и белок TetR – репрессор тетрациклина; второй же кодировал мутантный H-Ras (G12V), промотор для экс-

прессии которого содержал регуляторную последовательность Tet-operator – сайт связывания TetR. Эта система была выбрана для возможности индуцибельной экспрессии H-Ras. Так, тетрациклин, добавленный в культуральную среду, связывался с TetR и препятствовал его взаимодействию с регуляторной последовательностью Tet-operator, активируя экспрессию гена интереса.

Клетки с сверхэкспрессией H-Ras характеризовались остановкой пролиферации, увеличением размера, повышенной вакуолизацией, активацией p53/p21/Rb и Raf/MEK/ERK/p90RSK сигнальных каскадов, активностью β -галактозидазы, ассоциированной со старением (SA- β -Gal). Помимо этого, в ядрах клеток удалось обнаружить фокусы повреждения ДНК, маркированные фосфорилированием гистона H2AX. Совокупность полученных результатов позволяет говорить об индукции онкоген-индуцированного старения в ЭСК при сверхэкспрессии H-Ras.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-10038).

АНАЛИЗ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРЕПАРАТОВ ЭНЗАСТАУРИНА, БОРТЕЗОМИБА И ДЕКСАМЕТАЗОНА В КОМБИНАЦИИ С ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИМИ МОДУЛЯТОРАМИ В ТЕСТ-СИСТЕМЕ HELA T1

О. Г. Усалка^{1, 2, *}, В. П. Максимова¹, Ю. В. Макусь^{1, 3}, Г. И. Хайриева², М. Г. Якубовская¹, К. И. Кирсанов^{1, 3}

¹ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина”, Москва, Россия

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

³ФГАОУ ВО РУДН, Москва, Россия

*E-mail: ousalka@mail.ru

Нарушение эпигенетической регуляции транскрипции является одним из основных молекулярных механизмов, обеспечивающих прогрессию опухоли. Современная противоопухолевая терапия включает в себя применение препаратов, модулирующих активность и экспрессию ферментов эпигенетической регуляции транскрипции. Поиск и изучение механизмов новых эпигенетически активных препаратов среди уже используемых лекарственных средств и их дальнейшее перепрофилирование является актуальной задачей современной онкологии. Ранее нами была продемонстрирована способность энзастаурина, бортезомиба и дексаметазона реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированных генов.

Целью данного исследования является изучение влияния препаратов энзастаурина, бортезомиба и дексаметазона в комбинации с эпигенетическими модуляторами 5-азацитидином и трихостатином А на реактивацию экспрессии эпигенетически репрессированного гена *GFP* в тест-системе HeLa T1.

Анализ эпигенетической активности оценивали по уровню экспрессии гена *GFP* в клетках HeLa T1 с помощью проточной цитометрии. Все препараты были использованы в нетоксичных концентрациях. Для нокдауна генов *HDAC1* и *DNMT3A* использовали метод транзientной трансфекции siRNA. Для статистического анализа данных применяли ANOVA с апостериорным тестом Шидака.

Было показано, что при обработке клеток HeLa T1 с нокдауном гена *HDAC1* 5-азацитидином (5-aza, ингибитор ДНК-метилтрансфераз), а также клеток HeLa T1 с нокдауном гена *DNMT3A* трихостатином (TSA, ингибитор гистоновых деацетилаз) происходит статистически значимое увеличение числа GFP-положительных клеток относительно индивидуального действия агентов и siRNA. При этом обработка клеток HeLa T1/siHDAC1 и HeLa T1/siDNMT3A 5-aza и TSA соответственно не приводила к увеличению доли GFP+-клеток. Таким образом, при совместном действии агентов, влияющих на разные классы эпигенетических ферментов, в тест-системе HeLaT1 будет наблюдаться синергизм их эффектов. В популяции HeLa T1 количество GFP+-клеток составляет 4.3%. При действии 5-aza и TSA доля GFP+-клеток увеличивается до 13.8 и 15%. Показано, что при обработке энзастаурином доля GFP-положительных клеток составляет 42.5%, а при совместном действии энзастаурина с 5-aza и TSA незначимо увеличивается до 54.4% ($p = 0.06$) и 51.8% ($p = 0.24$) соответственно. При действии бортезомиба доля клеток, экспрессирующих GFP, составляет 25.6%, а в комбинациях с 5-aza и TSA статистически значимо увеличивается до 33.6% ($p = 0.003$) и 36.4% ($p = 0.006$) соответственно. Было показано, при действии дексаметазона реактивация GFP происходит в 30.4% клеток, а при его комбинации с 5-aza и TSA – в 47.2% ($p = 0.05$) и 37.4% ($p = 0.99$) соответственно. Полученные данные свидетельствуют о схожих механизмах эпигенетического действия энзастаурина с 5-aza и TSA и дексаметазона с TSA, в то же время молекулярный механизм действия бортезомиба не ограничивается влиянием на активность ДНК-метилтрансфераз и гистоновых деацетилаз.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-7510163).

**ПРОТООНКОВЫЙ MDM2 АКТИВИРУЕТ PI3K-АКТ ПУТЬ ЗА СЧЕТ
ДЕГРАДАЦИИ ИНГИБИТОРА PTEN**

О. А. Федорова^{1,*}, С. Е. Парфеньев¹, А. А. Дакс¹, С. Р. Нецветай¹, О. Ю. Шувалов¹, А. И. Гудович¹,
Е. Ю. Смирнов¹, Ю. А. Гненная¹, О. М. Семенов¹, Н. А. Барлев¹

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

*E-mail: fedorovaolgand@gmail.com

MDM2 является главной E3-убиквитинлигазой важнейшего онкосупрессора человека-белка p53, маркирующей данный белок для последующей деградации в протеасомах. Помимо p53, MDM2 взаимодействует, по меньшей мере, с 200 различными белками, и является, таким образом, точкой конвергенции различных сигнальных путей онкогенеза. Белок PTEN является фосфатазой и ключевой молекулой сигнального пути PI3K/АКТ. PTEN является ключевым онкосупрессором, который подавляет рост клеток и повышает чувствительность клеток к апоптозу.

В нашем исследовании мы показали, с помощью GST-pulldown, а также ко-иммунопреципитации, что MDM2 взаимодействует с белком PTEN. Нами была создана клеточная линия с сверхэкспрессией MDM2 “дикого типа”, MDM2 mut с мутацией в 462 положении С462А. Мутация MDM2 в 462 положении RING-домена приводит к тому, что MDM2 может взаимодействовать с белками-мишенями, но не влияет на их деградацию. Мы провели стандартный эксперимент по определению периода полужизни белков с ингибитором трансляции циклогексимидом. Так, в клеточных линиях с сверхэкспрессией MDM2 “дикого типа” после добавления циклогексимиды наблюдается достоверно более быстрое снижение уровня белка PTEN. С помощью метода убиквитинилирования *in vitro* мы показали, что только MDM2 “дикого типа” способен модифицировать PTEN. Мы также продемонстрировали, что сигнальный путь PI3K-АКТ активирован в клеточной линии с сверхэкспрессией MDM2.

Анти-HER2-терапия в настоящее время одобрена для лечения HER2-позитивного рака молочной железы, желудка и пищевода. Для наших экспериментов мы взяли одобренные Управлением по контролю продуктами и лекарствами США (FDA) ингибиторы тирозинкиназ (TKI). Мы показали, что при повышенной экспрессии только MDM2 “дикого типа”, но не его каталитического мутанта, наблюдается резистентность к TKI. Биоинформатический анализ выживаемости пациентов с HER2-позитивным РМЖ, показал, что у пациентов с повышенной экспрессией MDM2 продолжительность жизни была достоверно ниже. Мы связываем это с тем, что при повышенной экспрессии MDM2 наблюдается снижение ответа на HER2-направленную таргетную терапию.

Обобщая полученные данные, мы показали белок-белковое взаимодействие PTEN-MDM2 и влияние MDM2 на стабильность PTEN. Кроме того, мы продемонстрировали, что MDM2 влияет на активацию PI3K-АКТ пути, что, предположительно, происходит из-за деградации важнейшего ингибитора PI3K пути — PTEN, а также, что активация PI3K каскада при повышенной экспрессии MDM2 приводит к резистентности к ингибиторам HER2.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-75-10076).

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АБЕРРАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК В ГЕНАХ СИСТЕМЫ ГОМОЛОГИЧНОЙ
РЕКОМБИНАЦИИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПРЕПАРАТАМ ПЛАТИНЫ НА МОДЕЛЯХ *IN VITRO***

А. А. Фролова^{1,2,*}, М. К. Ибрагимова^{1,2}, М. М. Цыганов¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

*E-mail: frolova_aa@onco.tnims.ru

Введение. Дефицит гомологичной рекомбинации (ДГР) приводит к репарации повреждений ДНК с помощью потенциально мутагенных механизмов, приводящих к риску малигнизации. При этом ДГР может быть обусловлен не только наличием зародышевых мутаций, но и другими механизмами. Предыдущие наши исследования на клиническом материале опухоли молочной железы, а также опухоли легкого, показали, что при наличии делеции BRCA1 и/или его низкой экспрессии пациенты наиболее чувствительны к схемам химиотерапии с включением препаратов платины. Однако полученные данные требуют дополнительных подтверждений на клеточных моделях с применением химиопрепарата, что позволит доказать, что эктопическая экспрессия генов гомологичной рекомбинации (ГР), обусловленная амплификациями и делециями данных генов, оказывает существенное влияние на химиочувствительность и способность опухолевых кле-

ток к прогрессии. Целью работы явилось исследование влияния хромосомных aberrаций генов ГР на химиочувствительность на моделях *in vitro*.

Материал и методы. Клетки стабильной клеточной линии рака молочной железы MCF-7, MDA-MB-231 и MDA-MB-468 культивировали в стандартных условиях. Анализ CNA-генетического ландшафта (анализ количества aberrаций) проводили на микроматрицах CytoScan HD Array, транскриптомный анализ осуществлялся на платформе Clariom S Assay. С помощью анализатора клеток iCELLigence изучали влияние цисплатина (500 мкг/мл) в трех концентрациях (10, 20 и 30 мкг/мл) на рост культур в режиме реального времени.

Результаты. В результате проведенного исследования было показано, что в клеточной линии рака молочной железы MCF-7 наблюдаются делеции в таких генах ГР как: *BRCA1*, *ATM*, *CDK12*, *CHEK1*; в MDA-MB-231 в генах *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD54L*, при этом для сравнения использовали клеточную линию MDA-MB-468, в которой делеций генов ГР не было вообще. Установлено, что значение клеточного индекса в контрольной группе MCF-7 на вторые сутки после воздействия цисплатина в 5, 9 и 10 раз выше по сравнению с группой с препаратом (соответственно для 10, 20 и 30 мкг/мл). Аналогичная картина характерна для клеток линии MDA-MB-231. Значение клеточного индекса через 48 ч после воздействия цисплатина равна: 0.62, 0.40 и 0.37, соответственно для 10, 20 и 30 мкг/мл, по сравнению со значением 2.62 в контрольной группе. Интересно отметить, что в клетках линии MDA-MB-468 наблюдается противоположный результат. Разница в клеточном индексе между контрольной группой и образцами практически отсутствует. При значении 3.05 в контроле значение клеточного индекса для 10 мкг/мл составило 2.71; для 20 мкг/мл: 2.59; для 30 мкг/мл: 2.23. Таким образом, в результате проведенного исследования на клеточных моделях было показано, что наличие aberrантного состояния генов гомологичной рекомбинации оказывает существенное влияние на чувствительность и эффективность применяемого химиопрепарата. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что оценка ДГР может иметь высокий предиктивный и прогностический потенциал.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-15-00169).

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПОДХОД В ЛЕЧЕНИИ BRCA-ПОДОБНЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М. М. Цыганов^{1,*}, М. К. Ибрагимова¹, Е. А. Усынин¹, Н. В. Литвяков¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

*E-mail: TsyganovMM@yandex.ru

Введение. Дефицит гомологичной рекомбинации (HRD-Homologous recombination deficiency) приводит к репарации повреждений ДНК с помощью потенциально мутагенных механизмов, приводящих к риску малигнизации. При спорадических формах рака процессы, лежащие в основе HRD, могут быть обусловлены не только наличием зародышевых мутаций, но и другими механизмами. Опухоли, фенотипически и генетически похожие на семейный BRCA1-ассоциированный рак молочной железы (PMЖ), имеют схожие свойства с таковыми и определяются как “BRCAness” (BRCA-подобные опухоли), и эти общие свойства могут иметь важное значение для лечения. Целью настоящей работы явилось исследование эффективности химиотерапии у BRCA-дефицитных больных PMЖ без герминальных мутаций.

Материал и методы. В работе был использован материал опухоли от 130 больных PMЖ. В ретроспективную группу вошли 90 пациенток. Всем пациентам проведена неоадьювантная химиотерапия (НХТ) по схемам AC (доксорубин + циклофосфамид), CAH (на основе капецитабина) или монотерапия таксотером. В проспективной группе ($n = 40$) больным в зависимости от статуса гена *BRCA1* назначалась персонализированная схема НХТ: либо CP (паклитаксел + карбоплатин), либо монотерапия таксотером. Для анализа aberrаций числа копий (CNA) проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах. При помощи ОТ-ПЦР проводили оценку экспрессии *BRCA1*. Для детекции метилирования CpG островков промоторной области *BRCA1* проведена метилчувствительная ПЦР.

Результаты. Установлено, что частота делеций у пациентов с частичной регрессией статистически значимо выше (27/51 больных) по сравнению с группой больных со стабилизацией (4/25 больных) и прогрессированием (1/9 больных) ($p = 0.0001$). Анализ безметастатической выживаемости (БМВ) показал, что наличие делеции обуславливает более высокие показатели (80%) выживаемости (log rank-test, $p = 0.009$). Кроме этого установлено, что с высокими показателями безметастатической выживаемости связаны наличие участков потери гетерозиготности (83%, log rank-test, $p = 0.02$) и гипоэкспрессия (75%, log rank-test, $p = 0.02$). Далее, было проведено проспективное исследование. Если у пациентов наблюдалась либо делеция, либо гипоэкспрессия (экспрессия менее 1) *BRCA1*, то данные больные были отнесены к группе с HRD (BRCAness),

остальные составили группу с нормальной функциональной активностью гена *BRCA1* (non BRCAness). Пациенты с BRCAness получали схему НХТ с включением препаратов платины, остальная группа получала таксотер в монорежиме. В группе пациентов, пролеченных по схеме СР, у 78.6% больных наблюдался объективный ответ на лечение (11/14 пациентов) при 100% 5-летней БМВ. Для пациентов второй группы (Таксотер), ответ опухоли регистрировался у 88.5% (23/26 больных) при показателях 5-летней БМВ в 93%.

Таким образом, полученные нами данные указывают на высокую предиктивную и прогностическую значимость определения делеции и уровня экспрессии *BRCA1* в опухолевой ткани для персонализированного назначения препаратов платины и таксанов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-15-00169).

РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ TDP1 НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

А. А. Чепанова^{1,*}, А. С. Филимонов², А. Л. Захаренко¹, О. Д. Захарова¹,
О. А. Лузина², Н. Ф. Салахутдинов^{2,3}, О. И. Лаврик^{1,3}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

³Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*E-mail: arinachepanova@mail.ru

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) – перспективная мишень для повышения эффективности противоопухолевых препаратов, поскольку участвует в удалении повреждений ДНК, образующихся под действием ингибиторов топоизомеразы 1 (Top1) (иринотекан и топотекан) (Pommier et al., 2010). Кроме того, в литературе имеется множество данных об участии Tdp1 в удалении повреждений ДНК, вызванных другими противоопухолевыми препаратами (олапариб, этопозид, темозоломид) с механизмом действия, отличным от ингибиторов Top1 (Comeaux, van Waardenburg, 2014).

В данной работе мы использовали несколько различных подклассов производных усниновой кислоты (УК), которые показали высокую активность в отношении рекомбинантной человеческой Tdp1 (Zakharenko et al., 2016, 2019; Filimonov et al., 2019). Мы изучили как их собственную токсичность, так и их влияние на цитотоксический эффект противоопухолевых препаратов, применяемых в клинике.

При исследовании собственной цитотоксической активности было показано, что гидразонотиазолы УК являются наиболее токсичными производными УК в отношении изученных клеточных линий (величины CC_{50} в диапазоне 3–15 мкМ). Енамины УК, бидериватизированные производные УК (несущие одновременно гидразонотиазольный и енаминовый фрагменты) и цианопроизводные УК обладают значительно меньшей цитотоксичностью (CC_{50} в диапазоне 30–100 мкМ).

Далее были выбраны нетоксичные концентрации для каждого соединения, и изучена их способность сенсibilизировать клетки к действию химиопрепаратов: топотекана (ингибитор Top1), олапариба (ингибитор PARP1), этопозид (ингибитор Top2) и темозоломида (алкилирующий агент).

Было показано, что гидразонотиазольные производные УК продемонстрировали выраженный сенсibilизирующий эффект к топотекану в отношении перевиваемых клеток, но в целом не усилили цитотоксичность других известных препаратов.

Енаминовые производные УК также проявляют сенсibilизирующий к топотекану эффект. Соединение ОЛ9-116, эффективный сенсibilизатор опухолей к действию топотекана, не оказало усиливающего действия на цитотоксический эффект других противоопухолевых препаратов.

Бидериватизированные соединения показали способность усиливать цитотоксичность олапариба в отношении клеток А-549 и MCF-7 и темозоломида в отношении клеток А-549. С учетом низкой токсичности, эти соединения являются интересными кандидатами для дальнейших исследований.

Среди цианопроизводных веществ ОЛ7-43 нетоксично для разных типов клеток и сенсibilизирует к действию олапариба две клеточные линии.

Таким образом, применение ингибиторов Tdp1, предположительно, позволит повысить эффективность противоопухолевой терапии и/или снизить дозировки применяющихся в клинической практике противоопухолевых препаратов, уменьшив их токсическое воздействие на организм.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-14-00105).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Filimonov A.S., Chepanova A.A., Luzina O.A., Zakharenko A.L., Zakharova O.D., Ilina E.S., Dyrkheeva N.S., Kuprushkin M.S., Kolotaev A.V., Khachatryan D.S., Patel J., Leung I.K.H., Chand R., Ayine-Tora D.M., Reynisson J. et al. 2019. New hydrazinothiazole derivatives of usnic acid as potent Tdp1 inhibitors. *Molecules*. V. 24: 3711.

Pommier Y., Leo E., Zhang H. L., Marchand C. 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* V. 17. P. 421.

Zakharenko A., Dyrkheeva N., Lavrik O. 2019. Dual DNA topoisomerase 1 and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibition for improved anticancer activity. *Med. Res. Rev.* V. 39: 1427.

Zakharenko A., Luzina O., Koval O., Nilov D., Gushchina I., Dyrkheeva N., Švedas V., Salakhutdinov N., Lavrik O. 2016. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors: Usnic acid enamines enhance the cytotoxic effect of camptothecin. *J. Nat. Prod.* V. 79: 2961.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЭФФЕКТА НОВОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КОНЬЮГАТА НА ОСНОВЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ХЛОРИНА Е6

О. В. Шевченко^{1,*}, И. Н. Черненко¹, Н. А. Змитрович¹, Н. А. Елизарьев¹, Н. Г. Плехова¹

¹ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия

*E-mail: tarakovaolga@gmail.com

Согласно данным, представленным Global Cancer Observatory, в 2020 г. в мире было зарегистрировано около 10 млн смертей от рака. Помимо традиционных методов терапии в онкологии не последнее место занимает фотодинамический метод, основанный на применении светочувствительных веществ, при облучении которых генерируются разрушительные для злокачественной клетки активные формы кислорода. Следовательно, актуальна разработка новых препаратов, позволяющих обойти такой серьезный недостаток метода как возможность лечения глубоко расположенных опухолей. Нами впервые был синтезирован молекулярный конъюгат, содержащий в структуре фотосенсибилизатор Хлорин Е6, а также хелатированный европий, способный выступать в качестве донора энергии при облучении. Согласно литературным данным, введение европия в структуру новых веществ эффективно для проведения терапии с применением рентгеновского и гамма-излучения. В данном исследовании мы изучаем возможность возбуждения его красным светом и тормозным излучением. В связи с этим ожидается, что по донорно-акцепторному механизму будет осуществляться передача энергии люминесценции от комплекса европия к фотосенсибилизатору, в результате чего повысится эффективность генерации активных форм кислорода, разрушающих опухолевую клетку.

Исследование цитотоксических свойств молекулярного конъюгата на клетках асцитной аденокарциномы Эрлиха проводили методом МТТ-теста (Sigma-Aldrich, США) после 24 ч контакта с веществами, что позволило выбрать следующие эффективные дозы: 1.56, 3.125, 6.25 и 12.5 мкг/мл. Жизнеспособность клеток определяли методом проточной цитометрии (MACSQuant Analyzer 10, Германия) с помощью флуоресцентного ДНК-маркера 7-AAD (BioLegend, США) при возбуждении лазером 488 нм и эмиссии 647 нм. На 4 сутки после контакта с Хлорином Е6 (ООО "Вета-Гранд", Россия) в дозе 12.5 мкг/мл и облучении красным светом (645 нм, 6 Дж/см², 15 мин) показатель некротизированных клеток составил 62.38%, тогда как с молекулярным конъюгатом 96.50%. После тормозного облучения (2 Гр, 6 МэВ) этот параметр соответственно был равен 40.91 и 95.59%. Показатели жизнеспособности и апоптоза клеток были также определены с помощью флуоресцентного микроскопа после окрашивания Annexin V/Propidium Iodide (BioLegend, USA). Процент клеток в начальной стадии некроза составил 76% и в конечной стадии 24%. Тогда как при указанной дозе эффект конъюгата на гибель клеток оказался более выраженным – 25 и 75% соответственно. Методом щелочного кометного анализа проведено исследование генотоксического действия молекулярного конъюгата и Хлорина Е6 на клетки. Показано, что на 4 сутки после облучения красным светом степень поврежденности ДНК по параметру "длина хвоста кометы" (TailLength) для веществ в дозе 12.5 мкг/мл составила 148 ед. для Хлорина Е6 и 386 для молекулярного конъюгата. После тормозного облучения соответствующие значения составили 341 и 553 ед. соответственно.

Полученные в ходе экспериментов данные свидетельствуют о более разрушительном влиянии тормозного облучения, условия которого были подобраны нами в ходе исследования. Показано, что новое вещество, представляющее собой конъюгированный Хлорин Е6, обладает большей токсичностью, в том числе, генотоксичностью, для опухолевых клеток, нежели свободный Хлорин Е6. Обнаруженные свойства позволяют рассматривать это соединение в качестве перспективного и эффективного препарата для ФДТ при онкологии.

ТРАНСГЛУТАМИНАЗА 2 ТИПА И МЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ В КОНТЕКСТЕ ОТВЕТА НА ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНКЕ. А. Шмидт^{1, *}, Е. Ю. Смирнов¹, Н. А. Барлев¹¹*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия***E-mail: evashmidt28@gmail.com*

Трансглутаминаза 2 типа (TG2) – фермент, катализирующий образование ковалентных сшивок между свободными аминогруппами. TG2 повсеместно встречается как в клетке, так и во внеклеточном пространстве, и участвует в процессах апоптоза, передачи сигналов и клеточной адгезии. Известно, что нарушение функциональной активности TG2 ассоциировано со многими заболеваниями, в том числе, фиброзом и злокачественной онкологией. Одним из подходов к лечению онкологических заболеваний является химиотерапия, которая включает в себя применение широкого спектра противоопухолевых препаратов, среди которых наиболее эффективными остаются ДНК-повреждающие агенты, такие как доксорубин, эпоподид и цисплатин.

Ранее, при помощи МТТ-теста, нами было обнаружено снижение выживаемости клеточной линии мышечных эмбриональных фибробластов, нокаутных по TG2, в сравнении с линией дикого типа при обработке вышеописанными противоопухолевыми препаратами. Таким образом, было предположено, что повышение чувствительности нокаутной клеточной линии может быть обусловлено нарушением работы белковых комплексов, участвующих как в репарации, так и в модификациях гистонов, связанных с ответом на повреждение ДНК. Среди гистоновых модификаций особое место занимает метилирование гистонов, представляющее собой эпигенетическую модификацию, способствующую регуляции экспрессии генов, ингибированию или активации клеточных процессов. К примеру, монометилирование гистона H4 по 20-ому лизину влияет на активацию транскрипции, а деметилирование участвует в маркировке точек репликации и связано с 53BP1 – центральным фактором репарации.

По результатам иммуноблоттинга было выявлено, что в клетках, нокаутных по TG2, наблюдалось увеличение количества H3K4me3, H4K20me1 и H4K20me2 и снижение H3K9me3, H3K36me3. Методом ОТ-ПЦР было показано отсутствие изменения в экспрессии метилаз KMT5A, KMT5B, KMT5C на уровне мРНК, но, при этом, повышение уровня экспрессии деметилазы RNF8 в нокаутной линии.

Изменение чувствительности к ДНК-повреждающим агентам при нокауте TG2 может быть обусловлено изменениями в профилях метилирования гистонов, однако, несмотря на существенное различие в уровнях метилированных гистонов между нокаутной линией и линией дикого типа, нами не было обнаружено значительной разницы в экспрессии метилаз и деметилаз гистонов на уровне мРНК.

Исследование поддержано Мега-грантом № 14.W03.31.0029.

СЕКЦИЯ “МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПАТОЛОГИЙ”**ВЛИЯНИЕ ОПЫТА РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА СТРЕСС-РЕАКТИВНОСТЬ МЫШЕЙ ЛИНИИ ВТВР**К. А. Айриянц^{1, *}, А. М. Сапронова¹, А. А. Иванчихина², Н. П. Бондарь¹, В. В. Решетников^{1, 3}¹*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*²*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*³*Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи, Россия***E-mail: k.a.ayriyants@gmail.com*

Расстройства аутистического спектра (РАС) – одно из самых распространенных заболеваний нейроразвития в развитых странах. Известно, что стрессовые жизненные события в ранний постнатальный период могут вносить вклад в формирования многих психопатологий (шизофрения, большое депрессивное расстройство, биполярное расстройство), а также РАС. Одним из механизмов, который может участвовать в развитии этих расстройств, считают дисрегуляцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) во время критических периодов развития. Линия мышей ВТВР демонстрирует аутизм-подобный фенотип и поэтому подходит для исследования различных воздействий, моделирующих развитие данного заболевания. Целью нашей работы было оценить изменения в активности ГГНС после перенесенного раннего постнатального стресса у мышей линии ВТВР, являющихся моделью аутизма, и у мышей линии C57Bl/6 в качестве высокосоциального контроля.

Животных обеих линий подвергали стрессовому воздействию с 3 по 15 дни жизни (ДЖ) разделением с матерью на 3 ч в день (группы C57Bl/6-MS и BTBR-MS) Контрольные группы животных не подвергали раннему постнатальному стрессу (группы C57Bl/6-C и BTBR-C). На 41 ДЖ половину животных подвергали острому стрессу рестрикции на 1 ч.

Ранний постнатальный стресс приводит к снижению относительного веса надпочечников у мышей линии C57Bl/6, но не у BTBR. Однако мыши линии BTBR демонстрировали более низкий индекс надпочечников относительно линии C57Bl/6. Базальный уровень кортикостерона не отличался ни между линиями, ни в группах с опытом постнатального стресса. Однако после острого стресса мыши линии BTBR демонстрировали больший подъем этого гормона относительно мышей линии C57Bl/6. Кроме того, было обнаружено, что животные C57Bl/6-MS показывали меньший подъем кортикостерона после рестрикции, чем контрольные животные C57Bl/6-C, не подвергавшиеся стрессу в ранний период жизни. Анализ экспрессии ключевого гена ГГНС кортиколиберина (*Crh*) в гипоталамусе показал, что рестрикция приводит к подъему этого показателя, однако, экспрессия этого гена была ниже у животных линии C57Bl/6-MS относительно C57Bl/6-C.

При оценке уровня экспрессии ключевых генов стероидогенеза в надпочечниках мы выявили, что экспрессия двух гена *Star* и *Cyp11a1* достоверно повышалась в ответ на острый стресс и, кроме того, это повышение было более выражено у мышей линии BTBR. При анализе экспрессии генов *Mc2r* и *Cyp11b1* было обнаружено, что острый стресс приводил к повышению экспрессии этих генов. Однако были обнаружены и некоторые межлинейные различия: так, уровень гена *Cyp11b1* на базальном уровне у мышей BTBR ниже, чем у животных линии C57Bl/6. Острый стресс не оказал влияние только на один ген — *Hsd11b1*.

Таким образом, мыши линии BTBR демонстрируют повышенную стресс-реактивность относительно мышей C57Bl/6. Опыт раннего постнатального стресса не влияет на активность ГГНС на базальном уровне у обеих линий, но изменяет реакцию на острый стресс у мышей линии C57Bl/6.

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0002.

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ ВЫЗЫВАЕТ ПОЖИЗНЕННОЕ НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС

О. В. Ветровой^{1, 2, *}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: vov210292@yandex.ru

Пренатальная гипоксия (ПГ) является фактором риска развития множества тяжелых неврологических заболеваний. Известно, что стрессорная реакция матери на гипоксию сопряжена с эпигенетическим нарушением перинатальной экспрессии глюкокортикоидных рецепторов (ГР) в гиппокампе потомства, однако информации о том, как это влияет на функциональное состояние глюкокортикоидной системы в дальнейшем онтогенезе, недостаточно.

В рамках настоящего исследования были изучены долгосрочные эффекты ПГ на функционирование глюкокортикоидной системы на протяжении всей жизни, а также осуществлена проверка прямой связи между стрессорным ответом матери и устойчивым нарушением экспрессии ГР в гиппокампе потомства.

В ответ на предъявление первого гипоксического сеанса в плазме крови беременных крыс происходит увеличение количества кортикостерона (КС), однако при повторном предъявлении гипоксии уровень КС не отличается от контрольного, а в дальнейшем его количество снижается. В плазме крови новорожденных крысят, переживших ПГ, количество КС также ниже контроля, что сопровождается увеличением количества ГР в печени. Активность глюкозо-6-фосфатазы (Г6Фазы) печени и количество глюкозы в плазме крови ПГ крысят не отличаются от контроля, что указывает на компенсацию недостатка КС повышенным количеством ГР в печени на этом этапе онтогенеза. Однако при анализе гиппокампальных звеньев глюкокортикоидной системы новорожденных ПГ крысят нами показано уменьшение как общего количества ГР и их ядерной локализации, так и интенсивности транскрипции глюкокортикоид-зависимых генов. Уменьшение количества ГР и интенсивности глюкокортикоид-зависимой транскрипции в гиппокампе сохраняется на протяжении всей жизни, сопровождаясь нарушением контроля глюкокортикоидной отрицательной обратной связи и, как следствие, нормализацией базального уровня КС в плазме ювенильных крыс и его стабильным увеличением у взрослых и стареющих животных. Хроническое повышение уровня КС вызывает снижение количества ГР в печени до контрольного уровня у взрослых крыс и дальнейшее уменьшение их количества у стареющих крыс, что сопровождается уменьшением активности Г6Фазы и гипогликемией.

Для оценки роли глюкокортикоидного стрессорного ответа матери на гипоксию в формировании выявленной периферической и центральной дисфункции глюкокортикоидной нейроэндокринной системы потомства была проведена дополнительная серия экспериментов с использованием ингибитора синтеза кортикостерона метирапона. Подавление материнской глюкокортикоидной реакции на гипоксию инъекцией метирапона беременным крысам перед каждым гипоксическим сеансом предотвращает снижение белковой экспрессии ГР в гиппокампе потомства.

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что именно стрессорный ответ матери на гипоксию опосредует нарушение чувствительности гиппокампа плода к глюкокортикоидам, что в дальнейшем определяет центральные и периферические нарушения функционирования глюкокортикоидной системы.

ОСОБЕННОСТИ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ МОДЕЛЯХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В. А. Вигонт^{1,*}, Д. А. Грехнев¹, Е. В. Казначеева¹

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

**E-mail: vvigand@gmail.com*

Одной из центральных проблем современной нейробиологии является борьба с нейродегенеративными заболеваниями и анализ причин селективной уязвимости нейронов при различных патологиях. Понимание причин избирательной нейрональной гибели позволит глубже проникнуть в молекулярный патогенез заболеваний и будет способствовать созданию новых эффективных и высокоспецифичных методов терапии. Нами показано, что нарушения кальциевой сигнализации являются центральным звеном в патогенезе ряда нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона и спиноцереbellарные атаксии 1 и 17 типов. В частности, были отмечены патологически высокие уровни входа кальция через потенциал-управляемые и депо-управляемые каналы плазматической мембраны. Использование в работе пациент-специфичных клеточных моделей заболевания, основанных на генетическом репрограммировании фибробластов в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки с их последующей дифференцировкой в нейроны различных типов, позволит установить связь между уязвимостью нейронов в данном конкретном заболевании и степенью выраженности нарушений кальциевой сигнализации. Уже сейчас можно сказать, что такая связь прослеживается для группы полиглутаминовых нейродегенеративных заболеваний, для которых мы показали, что ГАМК-ергические нейроны стриатума, сильно подверженные дегенерации при болезни Хантингтона и спиноцереbellарной атаксии 17 типа, демонстрируют существенно повышенные уровни депо-управляемого и потенциал-управляемого входа кальция в моделях этих заболеваний. В то же время, для спиноцереbellарной атаксии 1 типа гибель данных нейронов не характерна, что находит свое отражение в неизменном потенциал-управляемом входе кальция и тенденции к снижению притока кальция через депо-управляемые каналы. Также для изогенной палитры моделей болезни Паркинсона мы показали устойчивую связь между патологическим увеличением депо-управляемого входа кальция с мутацией в гене, кодирующем LRRK2, для наиболее уязвимых при данной патологии дофаминергических нейронов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021) и РНФ (проект № 22-14-00218).

ВЛИЯНИЕ АЦЕТАМИНОФЕНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ

Ю. А. Власова^{1,2}, Е. А. Юсько^{1,*}, П. И. Громова¹

¹ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

²ИМО ФГБУ "НМИЦ им. В.А. Алмазова" Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**E-mail: yusko.elizaveta@mail.ru*

Актуальность: ацетаминофен (АРАР, парацетамол) считается безопасным и эффективным препаратом, используемым уже много лет. В высоких дозах он вызывает гепатотоксичность, и этот эффект хорошо изучен. Но исследований, посвященных изучению внепеченочной токсичности АРАР не много. Вызывает вопрос возможная нейротоксичность препарата. Известно, что АРАР хорошо проникает через ГЭБ, оказывая влияние на функции мозга взрослых людей, например, снижая способность выявлять ошибки при выполнении простых задач. Существуют исследования, показывающие, что АРАР притупляет реакцию, например на угрожающие стимулы. Широко обсуждается вопрос о возможной взаимосвязи между применением АРАР во время беременности и развитием нервно-психических нарушений у детей.

Целью исследования является изучение влияния АРАР и его метаболита NAPQI на митохондриальный мембранный потенциал (ММП) нейронов коры мозга плодов крыс.

Методы: нейроны коры мозга крыс выделяли, как описано ранее (Власова и др., 2021). За сутки до эксперимента в инкубационную среду вносили 1 мкг/мл АРАР или 0.15 мкг/мл метаболита АРАР N-ацетил-п-бензохинонимина NAPQI. Определение ММП проводили согласно описанному ранее протоколу (Власова и др., 2016). Статистическую обработку проводили методом попарных сравнений по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты: снижение уровня флуоресценции соответствует снижению ММП в нейронах. В контрольных клетках, не подвергавшихся действию АРАР или NAPQI, флуоресценция составила 0.19 ± 0.01 условных единиц флуоресценции, в клетках подвергнутых действию АРАР – 0.17 ± 0.006 (различия по сравнению с контролем не достоверны). В клетках, инкубированных с NAPQI, уровень флуоресценции снизился до 0.16 ± 0.003 различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что метаболит NAPQI оказывает более выраженное токсическое действие, чем АРАР, на нейроны коры мозга плодов крыс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Власова Ю.А., Голованова Н.Э., Бейшебаева Ч.Р., Загородникова К.А., Соколова М.Н., Дадали В.А., Антонова Ж.В. 2021. Исследование нейротоксичности парацетамола и его метаболита NAPQI (краткое сообщение). Лабораторные животные для научных исследований. Т. 4. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-04-09>

Власова Ю.А., Захарова И.О., Аврова Н.Ф. 2016. Влияние альфа-токоферола и H₂O₂ на мембранный потенциал митохондрий и отношение Вах/Vcl-XI в клетках РС12. Нейрохимия. Т. 33. № 4. С. 344.

ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ УЯЗВИМОСТЬ НЕЙРОНОВ ПРИ СПИНОМОЗЖЕЧКОВЫХ АТАКСИЯХ 1 И 17 ТИПОВ И АБЕРРАНТНАЯ КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

Д. А. Грехнёв¹, А. А. Ошколова¹, Е. В. Казначеева¹, В. А. Вигонт¹

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

*E-mail: dima.grehnyov@yandex.ru

Разнообразные нейродегенеративные патологии характеризуются уникальным паттерном уязвимости нейронов, ассоциированным с характерной клинической картиной заболевания. Интригующий для исследователей вопрос, почему при конкретной патологии одни нейроны массово гибнут, в то время как другие остаются практически не вовлеченными в патологический процесс, остается открытым. Наш проект направлен на решение данного вопроса в контексте двух достаточно близких полиглутаминовых заболеваний – спинозжечковых атаксий (СМА) 1 и 17 типов, имеющих разный паттерн гибели нейронов. В нашем распоряжении имеются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) полученные путем репрограммирования фибробластов от больных СМА1 и СМА17 и нескольких здоровых доноров. С помощью технологий направленной дифференцировки пациент-специфичных ИПСК в разные типы нейронов (для каждого типа нейронов подтверждена экспрессия специфичных маркеров) мы получили возможность исследовать патологические механизмы данных заболеваний с учетом нейрональной уязвимости при данных патологиях. На первом этапе мы изучили механизмы кальциевой сигнализации в ГАМК-ергических нейронах, которые массово гибнут при СМА17 и практически не затронуты при СМА1. С помощью метода пэтч-кламп в конфигурации регистрации токов через плазматическую мембрану всей клетки мы показали значительное увеличение депо- и потенциал-управляемых токов кальция в ГАМК-ергических нейронах больных СМА17 и отсутствие ярко выраженных нарушений депо- и потенциал-управляемых токов кальция в ГАМК-ергических нейронах больных СМА1 в сравнении с в ГАМК-ергическими нейронами здоровых доноров. Анализ вольт-амперных характеристик депо-управляемых токов кальция в ГАМК-ергических нейронах больных СМА17 показал наличие выраженных выходящих токов на положительных потенциалах, что характерно для депо-управляемых каналов, образованных белками TRPC и отсутствие подобных токов в ГАМК-ергических нейронах больных СМА1 и здоровых доноров. Таким образом, белки семейства TRPC становятся краеугольным камнем в патологически увеличенном депо-управляемом входе кальция в массово гибнущих ГАМК-ергических нейронах при СМА17. На втором этапе мы сравнили амплитуду депо-управляемых токов кальция в дофаминергических нейронах здоровых доноров и пациента с СМА17, у которого по клиническим данным дофаминергические нейроны были значительно меньше вовлечены в патологический процесс гибели на терминальной стадии заболевания. Мы показали отсутствие ярко выраженного изменения депо-управляемого входа кальция в дофаминергических нейронах пациента с СМА17 в сравнении с дофаминергическими нейронами здоровых доноров. Таким образом, депо-управляемый вход кальция может играть ключевую роль в селективной уязвимости нейронов при СМА17.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Минобрнауки РФ № 075-15-2020-795 (Соглашение 13.1902.21.0027) и РНФ (проект № 22-14-00218).

РАЗВИТИЕ ГИППОКАМП-АССОЦИИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЙ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА *IN VIVO*

Е. Д. Гришина^{1,*}, Н. А. Красковская¹, А. И. Ерофеев¹, С. А. Пушкарева¹, Е. И. Герасимов¹,
О. Л. Власова¹, И. Б. Безпрозванный^{1,2}

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

²Юго-Западный медицинский центр университет Техаса, Даллас, штат Техас, США

*E-mail: eligrisha@yandex.ru

Снижение когнитивных функций при болезни Хантингтона (БХ) тесно связано с изменением синаптической пластичности и деградацией синаптических связей нейронов, происходящими в области коры, стриатума и гиппокампа. При этом нарушения в последней из структур являются наименее изученными. Для изучения этиологии когнитивных нарушений, связанных с гиппокампом, были проведены поведенческие тесты, морфологические и электрофизиологические эксперименты.

Для проведения эксперимента по изучению механизмов синаптической пластичности у мышей дикого типа и мышей линии YAC128, моделирующих БХ, использовался метод, основанный на измерении долговременной потенциации (ДВП). Сравнение значений ДВП подтверждают наличие когнитивных нарушений у мышей линии YAC128 в возрасте 4-х и 6-ти месяцев. Кроме того, у мышей с БХ по сравнению с мышами дикого типа в возрасте 4-х месяцев прослеживается тренд к уменьшению значения посттетанического потенцирования.

Для исследования плотности и морфологии дендритных шипиков CA1 нейронов была создана линия мышей YAC128-M путем кроссбридинга мышей с БХ и мышей линии M. Эксперимент показал значимые различия плотности дендритных шипиков у диких и трансгенных мышей в возрасте 6 месяцев. Однако к возрасту 9 мес., плотность дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа у мышей дикого типа оказалась выше, чем у мышей с БХ. Из результатов исследования возрастной динамики можно сделать вывод, что у CA1 нейронов мышей дикого типа с возрастом наблюдается выраженная тенденция к увеличению плотности дендритных шипиков, в то время как у животных с БХ этот показатель практически не изменился.

Для анализа когнитивных нарушений у мышей с БХ использовался водный лабиринт Морриса, позволяющий оценить гиппокамп-ассоциированные нарушения в формировании пространственной памяти. К концу обучающих сессий мыши дикого типа продемонстрировали способность к обучению и запоминанию новой информации, увеличив количество успешных попыток к 4-му дню обучения, в то время как у мышей линии YAC128 количество успешных попыток в 1 и 4 день осталось одинаковым. Однако в тестовый день процент времени в квадранте, где ранее находилась платформа, и число пересечений платформы существенно не отличались.

К возрасту 9-ти месяцев способность к обучению у мышей обоих генотипов в целом снизилась. В тестовый день количество пересечений зоны, где ранее находилась платформа, также достоверно не отличалось. При оценке количества успешных попыток также не было обнаружено различий, как между генотипами, так и мышами одного генотипа в первый и последний день обучающих сессий. Подводя итог, мы сделали вывод, что синаптические нарушения при БХ представляют собой системные и дегенеративные изменения в гиппокампе, влияющие на развитие когнитивной дисфункции при этой патологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 19-15-00184).

АГРЕГАЦИЯ НУКЛЕОПОРИНОВ С FG-ПОВТОРАМИ И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭТОГО ПРОЦЕССА

Л. Г. Данилов¹, Н. П. Трубицина¹, К. В. Суханова¹, Т. М. Рогоза^{1,2}, С. Е. Москаленко^{1,2}, М. В. Белоусов^{1,3},
А. Г. Матвеев¹, Г. А. Журавлева¹, С. А. Бондарев^{1,*}

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

²Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

³Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: stanislavspbgu@gmail.com

Ядерный поровый комплекс включает более 30 различных белков нуклеопоринов, которые подразделяют, согласно их функциям, на две группы: белки, поддерживающие структуру поры или формирующие селективный фильтр. Ко второй группе относят нуклеопорины, которые содержат повторы фенилаланина и глицина (FG). Для некоторых из них, как и для ряда известных амилоидов, показана способность образовывать гидрогели. В том числе для этих белков описаны примеры формирования амилоидных агрегатов, среди них дрожжевой белок Nup100. В своей работе мы продемонстрировали, что белок человека NUP58 также может формировать амилоид с характерными свойствами *in vitro*, а также в клетках бактерий и дрожжей. Интерес к агрегации этого белка связан с его физическим взаимодействием с хантингином (Htt), амилоидные агрегаты которого формируются при болезни Хантингтона. Агрегаты NUP58 и Htt колокализуются в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, что позволяет предполагать наличие взаимосвязи между ними, а также вклад агрегации NUP58 в развитие патологии.

После идентификации амилоидных свойств NUP58 был поставлен вопрос о широте распространения этого явления. Для его решения мы провели обширный биоинформатический анализ известных ортологов нуклеопоринов. Нам удалось идентифицировать фрагменты нуклеопоринов с консервативными амилоидными свойствами в белках Nup49 и Nup57, а также Nsp1 и Nup159 и их ортологах (указаны названия белков дрожжей). Важно отметить, что подобные участки мы нашли только в белках, которые располагаются непосредственно в канале ядерной поры и участвуют в образовании селективного барьера. В ходе последующих экспериментальных проверок в модельных системах нам удалось найти три новых примера амилоидов. К ним относятся Nup58 *Taeniopygia guttata*, Nup98 *Drosophila melanogaster* и Nup98 *Schizosaccharomyces pombe*.

С целью описать биологическое значение феномена агрегации FG-нуклеопоринов мы проанализировали влияние этого процесса на ядерно-цитоплазматический транспорт и обнаружили, что агрегация белков Nsp1 и Nup145 дрожжей *S. cerevisiae* приводит к нарушениям импорта макромолекул в ядро. В качестве модельной системы был использован штамм дрожжей, продуцирующий GFP с сигналом ядерной локализации. Обнаруженное явление, с нашей точки зрения, скорее играет негативную роль, хотя выраженного влияния на жизнеспособность мы не обнаружили. В то же время, с учетом упомянутого взаимодействия NUP58 и Htt наши результаты могут быть первым свидетельством еще одного молекулярного механизма развития патологии при болезни Хантингтона и других протеинопатий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 17-74-10159) и РФФИ (проект № 20-34-70073), а также гостемы № 0112-2016-0015.

НЕЙРОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ БИСФЕНОЛА НА КЛЕТКИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ ЛИНИИ PC12

З. О. Доронин^{1,*}, Д. С. Гузенков¹, Ю. А. Власова^{1,2}, А. В. Кузнецов¹

¹ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

²ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: xmaiker@ya.ru

Актуальность. Бисфенол А (БФА) — ксеноэстроген, который обладает цитотоксичностью. Активно применяется в производстве полистирольных смол. В настоящее время все еще недостаточно исследований активности БФА в средних и низких дозах (мкМ и нМ) на разных культурах клеточных линий и различного времени воздействия.

Цели и задачи. Данная работа посвящена уточнению механизмов цитотоксичности БФА на культуре нейрональной клеточной линии.

Методы. Опыты проводили на культуре нейрональной клеточной линии PC12 (ATCC) в инкубаторе при 5% CO₂ и температуре 37°C. Клетки выращивали в питательной среде DMEM с L-глутамином, содержащей 10% сыворотки крови плодов коровы и 5% сыворотки крови лошади, 25 мкг/мл пенициллина и 25 ед/мл стрептомицина. Среду меняли каждые 2–3 дня. Клетки PC12 переносили из чашек Петри, в которых их выращивали, в планшеты. Количество клеток в 24-луночных планшетах составило 300 000 клеток в лунке. Эксперименты начинали через 24 ч после посева клеток в планшеты. В опытах применяли среду DMEM с глутамином, не содержащую сыворотки.

Определение накопления активных форм кислорода. Клетки инкубировали 24 ч с 0.25 или 0.5 мкМ БФА или без (контрольные). За 0.5 ч в среду вносили краситель DCHF*DA в концентрации 10 мкМ.

Измерение митохондриального мембранного потенциала (ММП). Клетки инкубировали 24 ч с 0.25 или 0.5 мкМ БФА или без (контрольные). За 20 мин до конца инкубации вносился краситель TMRM в концентрации 20 нМ. Измерение флуоресценции проводили на проточном цитометре Navios.

Статистическая обработка результатов проводилась методом попарных сравнений по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и выводы. Накопление АФК в контрольных клетках составило 0.384 ± 0.0 условных единиц флуоресценции (УЕФ), в клетках подвергнутых действию 0.25 мкМ БФА 0.652 ± 0.028 УЕФ, различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.05$). В клетках подвергнутых действию 0.5 мкМ БФА 0.855 ± 0.025 УЕФ, различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

Митохондриальный мембранный потенциал в контрольных клетках составил 157 ± 22 УЕФ. В клетках, подвергнутых действию 0.25 мкМ БФА, наблюдалось падение ММП, значение составило 42.1 ± 15.5 УЕФ, различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.05$). В клетках, подвергнутых действию 0.5 мкМ БФ, падение ММП было более выраженным — 24.7 ± 4.6 УЕФ, различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что в микромолярных концентрациях БФА может оказывать влияние на падение ММП в клетках РС12 и накопление в них АФК.

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *LIMK1* В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ НА ОБУЧЕНИЕ И ЗАБЫВАНИЕ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Е. С. Заломаева^{1,2,*}, Е. С. Егозова^{1,3}, А. В. Медведева², А. В. Журавлев², Е. А. Никитина^{1,2}

¹Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: zalomaeva.e@yandex.ru

Одна из актуальных проблем нейробиологии — понимание этиологии и патогенеза различных нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), в том числе болезни Альцгеймера, Паркинсона и др. Данные заболевания являются результатом сложного взаимодействия неблагоприятных внешних факторов, а также индивидуальных особенностей генома, предрасполагающих к развитию болезни. Одним из ведущих факторов развития НДЗ являются когнитивные нарушения. Основой обучения и памяти служит синаптическая пластичность нервной системы, в обеспечении которой важную роль играет реорганизация актинового цитоскелета. Ключевой фермент данного процесса — LIMK1. Также известно, что изменения экспрессии гена *limk1* приводят к нейрокогнитивным патологиям. Ген *limk1 D. melanogaster* имеет 71% гомологии с геном *limk1 H. sapiens*, в связи с чем дрозофила является наиболее удобным модельным объектом для осуществления исследования. В последние годы на первый план выходит вопрос о роли забывания в процессах обучения и сохранения памяти, чем обусловлена постановка цели исследования.

Цель — провести анализ формирования и динамики изменения краткосрочной памяти у самцов дрозофилы с нейроспецифическим подавлением и активацией экспрессии гена *limk1* в нервной системе.

Для подавления и активации экспрессии гена *limk1* у самцов *D. melanogaster* методом РНК-интерференции применяли систему скрещивания Gal4/UAS. Способность к обучению и формированию памяти оценивали методом условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ) самца за оплодотворенной самкой. Для выработки УРПУ 5-суточного самца, не имеющего опыта полового поведения, помещали в специальную камеру с оплодотворенной самкой линии дикого типа Canton-S на 30 мин. Для оценки эффективности обучения вычисляли индекс обучения (ИО). Для оценки способности к обучению, а также активности процессов забывания провели анализ формирования и скорости снижения ИО на коротких временных интервалах: 0, 15 и 30 мин после тренировки. Для статистического анализа использовали двусторонний тест рандомизации.

Исследование показало, что ИО у гибридов с подавлением и активацией экспрессии гена *limk1* в нервной системе сразу после обучения были достоверно выше нуля, и достоверно не отличались от таковых в контроле. Спустя 30 мин ИО у линии с подавлением *limk1* оставался на высоком уровне, в то время как ИО у линии с активацией *limk1* снизился практически до нулевого уровня. Мухи с активацией *limk1* оказались способными сохранять память лишь в течение 15 мин.

Таким образом, мухи обеих линий продемонстрировали способность к обучению и формированию памяти. Однако процессы забывания оказались выражены в большей степени у мух с активацией *limk1* в нервной системе. Полученные данные говорят о безусловной вовлеченности гена *limk1* в процессы активного врожденного забывания. Этот факт открывает широкие перспективы для дальнейшего изучения роли активного врожденного забывания в становлении и сохранении памяти при изменениях гена *limk1*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-015-00300 А).

НОВЫЙ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АГЕНТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Н. И. Зернов^{1,*}, Д. М. Мелентьева¹, А. В. Большакова¹, И. Б. Безпрозванный¹, Е. А. Попугаева¹

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

*E-mail: quakenbush97@gmail.com

Болезнь Альцгеймера (БА) — неизлечимая форма деменции. Число людей, страдающих БА, растет с каждым годом. Однако до сих пор не существует эффективного лечения заболевания.

БА характеризуется синаптической дисфункцией, которая ведет к прогрессирующей потере памяти. Недавно обнаружен новый сигнальный путь, управляемый каналом TRPC6 (Canonical transient receptor potential-6), который регулирует стабильность дендритных шипиков и играет роль в формировании памяти (Zhang et al., 2016). Мы предполагаем, что позитивная модуляция TRPC6 канала, стабилизируя синаптические контакты, будет предотвращать потерю памяти.

Ранее мы обнаружили, что агонисты TRPC6 канала вызывают положительный эффект на мышечных моделях БА и могут служить терапевтическими агентами для лечения этого заболевания (Zhang et al., 2016; Popugaeva et al., 2019).

В настоящем исследовании мы показали, что другой положительный модулятор TRPC6 канала, производный бензопирана, оказывает нейропротекторное воздействие. Мы обнаружили, что производное бензопирана в концентрациях 1 μ M и 100 nM устраняет потерю грибовидных шипиков при воздействии на нейроны β -амилоидом. Мы также продемонстрировали, что это соединение способно восстанавливать дефицит долговременной потенциации у восьмимесячных 5xFAD мышей. Кроме того, фармакокинетические исследования показали, что данное соединение стабильно в плазме до 4 ч и проникает через гематоэнцефалический барьер. Поведенческие тесты показали, что внутривенные инъекции производного бензопирана способствуют восстановлению контекстной и условной памяти у шестимесячных 5xFAD мышей. Экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что исследуемое соединение может являться перспективным фармакологическим агентом для лечения БА.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-75-10026).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Zhang H., Sun S., Wu L., Pchitskaya E., Zakharova O., Fon Tacer K., Bezprozvanny I. 2016. Store-operated calcium channel complex in postsynaptic spines: a new therapeutic target for Alzheimer's disease treatment. *J. Neurosci.* V. 36. P. 11837.

Popugaeva E., Chernyuk D., Zhang H., Postnikova T.Y., Pats K., Fedorova E., Poroikov V., Zaitsev A.V., Bezprozvanny I. 2019. Derivatives of piperazines as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Mol. Pharmacol.* V. 95. P. 337.

РЕГУЛЯЦИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ И СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В НЕЙРОПРОТЕКТОРНОМ ЭФФЕКТЕ УБАИНА В УСЛОВИЯХ ГЛУТАМАТНОЙ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ И ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

М. А. Иванова^{1,*}, П. А. Абушик¹, Д. А. Сибаров¹, С. М. Антонов¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: etrnlrddl@gmail.com

Общепризнано, что нейродегенерация, вызванная глутаматом и гомоцистеином, вызывается постоянной деполяризацией плазматической мембраны и перегрузкой нейронов цитозольным кальцием, что является состоянием, известным как эксайтотоксический стресс. Патологическое накопление гомоцистеина в плазме человека, известное как гипергомоцистеинемия, усугубляет нейродегенеративные заболевания, поскольку эта аминокислота действует как естественный агонист ионотропных рецепторов NMDA в головном мозге. Убаин представляет собой сердечный гликозид, который, как было показано ранее, вызывает нейропротекцию при эксайтотоксическом стрессе, вызванном агонистами ионотропных рецепторов глутамата.

Мы изучили влияние 0.1–1 нМ убаина на внутриклеточную передачу сигналов Ca^{2+} , напряжение внутренней мембраны митохондрий (ψ_{mit}) и жизнеспособность клеток в первичных нейронах коры головного мозга крыс при нейротоксических повреждениях глутаматом и гомоцистеином. Кроме того, оценили экспрессию белков, связанных с апоптозом, и участие некоторых киназ в опосредованных убаином эффектах.

При кратковременных инсультах гомоцистеин был менее эффективен, чем глутамат, в качестве нейротоксического агента и вызывал потерю fmit на 20%, тогда как глутамат вызывал снижение этого значения более чем в два раза. Субнаномолярный убаин оказывает немедленное и отсроченное нейропротекторное действие на нейроны. Убаин быстро уменьшал перегрузку нейронов Ca^{2+} и потерю fmit , вызванную глутаматом и гомоцистеином при кратковременном воздействии. При длительном (24 ч) эксайтотоксическом действии, убаин предотвращал апоптоз нейронов, запуская зависимые от протеинкиназы А и протеинкиназы С внутриклеточные нейропротекторные каскады для гомоцистеина, но не для глутамата.

Было изучено влияние убаина на экспрессию генов белков, участвующих в апоптотических каскадах, и антиапоптотических белков во время 4-часового нейротоксического действия глутамата и гомоцистеина. Уровни белков, таких как каспаза-3, p53 и BAX, вносящие вклад в каспазозависимый путь апоптоза, снижались во время действия убаина. Уровень индуцирующего апоптоз фактора (AIF) также оценивали вместе с Bcl-2, который препятствует высвобождению AIF из митохондрий. Таким образом, результаты демонстрируют важную роль убаина в регуляции накопления Ca^{2+} в нейронах, развитии митохондриальной дисфункции и внутриклеточных сигнальных путей, предотвращающих гибель кортикальных нейронов при индуцированной эксайтотоксичности, что предполагает существование различных подходящих фармакологических методов лечения гипергомоцистеинемии и эксайтотоксичности глутамата.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-15-00403).

УРОВЕНЬ мРНК IL6 И IL11 ИЗМЕНЯЕТСЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС В ПЕРИОД ОТМЕНЫ АЛКОГОЛЯ

П. Д. Игнатова^{1, *}, С. О. Ереско^{2, 3}, М. И. Айрапетов^{1, 2}

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

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия,

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

*E-mail: ignatova.polly@yandex.ru

Введение. Анализ литературных источников показал способность цитокинов семейства IL6 вносить изменения в механизмы развития таких заболеваний, как рассеянный склероз, аутоиммунный энцефаломиелит и ишемия головного мозга (Zhang et al., 2019a, b; Airapetov et al., 2021). Повышение экспрессии гена IL6 чаще всего служит признаком развития нейровоспалительного процесса, тогда как у другого цитокина из этого же семейства, IL11, на данный момент можно предположить наличие двойственного эффекта в развитии воспаления головного мозга — как провоспалительного, так и противовоспалительного.

Цель исследования. Оценить влияние длительной алкоголизации на относительное содержание мРНК IL6 и IL11 в головном мозге у крыс в период отмены алкоголя.

Материалы и методы. Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар ($n = 24$, в группе по 8 крыс). Моделирование алкоголизации осуществлялось посредством внутрижелудочного введения 20%-ного раствора этанола (2 г/кг) на протяжении 2 мес. По окончании эксперимента на 10-е сут отмены алкоголя забирали образцы структур головного мозга: гиппокамп (HIP), прилежащее ядро (NAc), миндалина (AMY). Контрольная группа животных получала эквивалентный объем воды внутрижелудочно. Была получена суммарная РНК, выполнены ОТ и Реал-тайм ПЦР. Данные были статистически обработаны. В качестве статистического критерия достоверности использовали t -критерий Стьюдента.

Результаты. Результаты эксперимента показали, что длительная алкоголизация привела к снижению уровня мРНК IL11 в NAc (в 3.86 раза, $p \leq 0.05$) и HIP (в 7.94 раза, $p \leq 0.05$) мозга крыс в период отмены алкоголя, при этом уровень мРНК IL11 в AMY 3.56 раза ($p \leq 0.05$). Длительная алкоголизация привела к снижению уровня мРНК IL6 в NAc (в 1.62 раза, $p \leq 0.05$), в HIP и AMY мозга крыс статистически значимых изменений не было обнаружено в содержании мРНК IL6.

Выводы. Длительная алкоголизация (2 мес.) привела к снижению уровня мРНК IL6, IL11 в NAc и IL11 в HIP и к повышению мРНК IL11 в AMY мозга на 10-е сут отмены алкоголя у крыс. Данные результаты выявляют прямо пропорциональную зависимость между данными цитокинами, но на данный момент нельзя достоверно определить роль IL11 в нейровоспалительных процессах головного мозга, для этого необходимо провести дальнейшие исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Airapetov M., Eresko S., Lebedev A., Bychkov E., Shabanov P. 2021. The role of Toll-like receptors in neurobiology of alcoholism. *BioScience Trends*. V. 2. P. 74.

Zhang X., Kiapour N., Kapoor S., Khan T., Thamilarasan M., Tao Y., Cohen S., Miller R., Sobel R.A., Markovic-Plese S. 2019. IL-11 Induces encephalitogenic Th17 cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* V. 203. P. 1142.

Zhang B., Zhang H.X., Shi S.T., Bai Y.L., Zhe X., Zhang S.J., Li Y.J. 2019. Interleukin-11 treatment protected against cerebral ischemia/reperfusion injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. V. 115. P. 1.

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У МЫШЕЙ

А. Р. Ильина*

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия

**E-mail: ilinaanastasiar@gmail.com*

Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание и основная причина деменции у лиц пожилого и старческого возраста. Нарушение когнитивных функций при БА тесно коррелирует со снижением количества синапсов нейронов гиппокампа (Tegny et al., 1991), функциональные изменения в которых проявляются в изменении морфологии и количества постсинаптических элементов (дендритных шипиков) (Bourne et al., 2008). Перспективными нейропротекторными соединениями являются короткие пептиды (Kraskovskaya et al., 2017). Цель работы – оценить влияние пептидов EDR (Glu–Asp–Arg) и KED (Lys–Glu–Asp) на морфологию дендритных шипиков нейронов гиппокампа в модели БА *in vivo*.

Для моделирования БА и визуализации нейронов использовали новую трансгенную линию мышей 5xFAD-M, полученную путем кросс-бридинга мышей линии 5xFAD и линии M (экспрессируют зеленый флуоресцентный белок в мозге). Морфологический анализ дендритных шипиков проводили на фиксированных срезах гиппокампа с использованием конфокального микроскопа ThorLabs (США) и программного обеспечения NeuronStudio, согласно статье (Rodriguez et al., 2008).

Пептиды EDR и KED способствовали восстановлению общей плотности дендритных шипиков на 13 и 22% у мышей-самцов линии 5xFAD-M и увеличению количества наиболее функциональных шипиков грибовидного типа на 25 и 27% соответственно, по сравнению с мышами дикого типа. У мышей-самок линии 5xFAD-M пептид EDR восстанавливал плотность дендритных шипиков на 12% до нормы, но не влиял на количество грибовидных шипиков.

Установлено, что пептиды EDR и KED обладают выраженным нейропротекторным эффектом в модели БА *in vivo*, который заключается в восстановлении количества синаптических контактов у мышей линии 5xFAD-M. При этом выявлены гендер-ассоциированные различия в нейропротекторном эффекте пептидов, обусловленные разной степенью выраженности патологии БА у мышей разного пола (Skaper et al., 2017). Полученные результаты свидетельствуют о перспективах дальнейшего изучения коротких пептидов EDR и KED в качестве терапевтических агентов на ранней стадии развития БА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bourne J.N., Harris K.M. 2008. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* V. 31. P. 47.

Kraskovskaya N.A., Kukanova E.O., Lin'kova N.S., Popugaeva E.A., Khavinson V.K. 2017. Tripeptides restore the number of neuronal spines under conditions of *in vitro* modeled Alzheimer's disease. *Bull. Exp. Biol. Med.* V. 163. P. 550.

Rodriguez A., Ehlenberger D.B., Dickstein D.L., Hof P.R., Wearne S.L. 2008. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS One*. V. 3: e1997.

Skaper S.D., Facci L., Zusso M., Giusti P. 2017. Synaptic plasticity, dementia and Alzheimer disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. V. 16. P. 220.

Terry R.D. et al. 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* V. 30. P. 572.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИНЗЕНОЗИДОВ *PANAX JAPONICUS* НА TLR-СИГНАЛИНГ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ДЛИТЕЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИА. Р. Искалиева^{1,*}, А. Г. Кулешова¹, С. О. Ереско^{2,3}, М. И. Айрапетов^{1,4}¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия³Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия⁴Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: iskalieva.adelia@mail.ru

Противовоспалительный эффект тритерпеновых гликозидов, содержащихся в экстракте растений рода Женьшень (*Panax*), описывается издавна, однако молекулярные механизмы остаются неустановленными. Известно о нейровоспалении, развивающемся вследствие длительного потребления этанола, и использовании гинзенозидов на различных моделях нейровоспаления у лабораторных животных. Интересным представляется оценить влияние гинзенозидов на состояние системы Toll-подобных рецепторов, задействованной в активации нейровоспаления в головном мозге крыс в условиях длительной алкоголизации.

Материалы и методы. Состояние нейровоспаления моделировалось полупринудительной алкоголизацией крыс линии Вистар ($n = 16$) 20%-ным раствором этанола в течение 2 мес. После отмены этанола в течение 7-ми сут были выполнены инъекции суммы гинзенозидов, предоставленных МГУ им. М.В. Ломоносова, внутривентрикулярно в дозе 50 мг/кг ($n = 8$) или физиологического раствора ($n = 8$). Интактная группа ($n = 10$) получала воду. Крыс декапитировали, извлекали гиппокамп (HIP), прилежащее ядро (NAc), стриатум (STR). Экспрессию целевых генов оценивали методом Реал-тайм ПЦР. Полученные данные нормированы по содержанию мРНК гена *Gapdh*.

Результаты и обсуждение. В группе алкоголизованных крыс не обнаружены изменения в содержании мРНК Tlr3 на 7-е сут отмены алкоголя в STR, тогда как в HIP наблюдалось повышение содержания мРНК в 1.6 раза, а в NAc – понижение в 4.7 раза. Содержание мРНК Tlr7 не изменялось в NAc, но было повышено в 1.4 раза в STR и в 3.2 раза в HIP. Уровень содержания мРНК Tlr4 превысил контрольные значения в 1.8 раза в NAc и в 11.5 раз в HIP. Экспрессия гена адаптерного белка Myd88 повысилась в NAc и HIP, в то время как не изменилась в STR. Содержание мРНК транскрипционных факторов NfκB и IRF3 не изменилось в NAc, повысилось в HIP в 1.9 и 2.9 раза, соответственно. В STR не обнаружено изменений в содержании NfκB, но отмечено повышение IRF3 в 4.7 раза. Наблюдались изменения в содержании мРНК цитокинов. Инъекции суммы гинзенозидов достоверно повышают уровень мРНК Tlr3 и снижают уровень мРНК IRF3 во всех анализируемых структурах. Снижение уровня мРНК Tlr4 замечено только в NAc, как и снижение уровня Tlr7 в HIP и STR. В различных структурах получены разнонаправленные изменения экспрессии генов при лечении инъекциями суммы гинзенозидов.

Выводы. Результаты анализа экспрессии факторов, участвующих в TLR-сигнализации, указывают на способность суммы гинзенозидов модулировать работу системы Toll-подобных рецепторов в головном мозге крыс в период отмены алкоголя, но стоит отметить, что изменения носят разнонаправленный характер. Это определяет необходимость изучения молекулярных механизмов работы структур мозга, отвечающих за когнитивный и эмоциогенный контроль, в условиях нейровоспалительного процесса.

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИОНОТРОПНЫХ И МЕТАБОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА КАК ФАКТОР ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗАА. А. Коваленко^{1,*}, М. В. Захарова¹, А. П. Шварц¹, А. В. Дёмина¹, О. Е. Зубарева¹, А. В. Зайцев¹¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: kovalenko_0911@mail.ru

Эпилепсия – хроническое неврологическое заболевание, проявляющееся в предрасположенности организма к внезапному возникновению судорог. Молекулярные перестройки, происходящие в процессе эпилептизации мозга, изучены недостаточно. Считается, что патогенез эпилепсии связан с нарушением баланса между тормозными (ГАМК) и возбуждающими (глутамат) системами в различных отделах мозга. Избыточное возбуждение, вызванное глутаматом при судорогах, может приводить к эксайтотоксичности и гибели клеток мозга. Функционирование глутаматергической системы обусловлено работой рецепторов глутамата. Особенности экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата при развитии острых и хронических судорожных состояний исследованы недостаточно.

Целью работы являлся комплексный анализ пространственно-временного паттерна экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата, а также различных субъединиц ионотропных NMDA- и AMPA-рецепторов в мозге крыс в моделях острого эпилептического статуса и эпилепсии.

Эксперименты были выполнены на самцах крыс Вистар. Для индукции эпилепсии использована литий-пилокарпиновая (Li-ПК) модель. Животным вводили раствор LiCl (в/б, 127 мг/кг), затем через 24 ч метилскополамин (в/б, 1 мг/кг), через 30 мин – пилокарпин (ПК, в/б, дробно 10–40 мг/кг). В другой экспериментальной модели для индукции острых судорог крысам вводили пентилентетразол (ПТЗ, в/б, 70 мг/кг). Исследование экспрессии генов субъединиц NMDA- (*Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*) и AMPA-рецепторов (*Gria1*, *Gria2*), метаботропных рецепторов глутамата (*Grm1-5*, *Grm7-8*) проводилось методом ОТ-ПЦР в реальном времени в дорзальной и вентральной областях гиппокампа и височной коре через 3 и 7 дней после индукции судорог в обеих моделях. В Li-ПК модели также анализ проводился в хроническую фазу модели.

Наиболее выраженные изменения уровней мРНК субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов после ПТЗ-индуцированных судорог наблюдались в дорзальном гиппокампе. Изменений экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата в данной модели не обнаружено. После ПК-индуцированных судорог экспрессия генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов снижалась во всех исследованных структурах, причем многие изменения сохранялись через 2 мес. после индукции судорог. Наиболее выраженные изменения экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата выявлены в латентную фазу Li-ПК модели, характер которых позволяет предположить их участие в эпилептизации мозга.

Таким образом, обнаружено, что судороги в обеих моделях приводят к изменениям экспрессии генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата. Нарушения продукции мРНК метаботропных рецепторов глутамата выявлены только в Li-ПК модели, и, вероятно, они являются одним из факторов эпилептогенеза.

ДИНАМИКА ПОСТСТРЕССОРНОГО НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ВОЗБУДИМОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Д. Т. Королевич^{1,*}, П. Ю. Филькова¹, И. Г. Шалагинова¹, Н. А. Дюжикова²

¹Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: korolevich.dana@gmail.com

Исследования показывают, что периферическое воспаление и иммунные изменения в головном мозге связаны с посттравматическим стрессовым расстройством у людей, а также у животных в моделях хронического стресса. Основные структуры, вовлеченные в патогенез постстрессорных расстройств – гиппокамп, префронтальная кора и миндалина.

Целью нашего исследования было оценить динамику постстрессорных изменений числа микроглиальных клеток и дегенерирующих нейронов, в гиппокампе и префронтальной коре крыс с различным уровнем возбудимости нервной системы.

Взрослые самцы крыс двух линий с контрастным порогом возбудимости нервной системы линия ВП (высокий порог, низкая возбудимость) и НП (низкий порог, высокая возбудимость) были разделены на контрольные и экспериментальные группы ($n = 6$ в каждой группе). В качестве модели психоэмоционального стресса использовали протокол длительного эмоционально-болевого воздействия по Гехту. Крыс помещали в прозрачную камеру с электрифицированным решетчатым полом. На протяжении 15 дней животные ежедневно в течение 13 мин подвергались действию стрессора: с интервалом в 1 мин подавали световые сигналы, часть из которых подкреплялись ударами электрического тока, а часть – нет.

Для отслеживания динамики изменений были выбраны четыре временные точки: 24 часа, 7 дней, 24 дня и 2 месяца после окончания действия стрессора. Иммуногистохимическое окрашивание тканей мозга проводили с целью определения экспрессии микроглиального маркера Iba-1, нейродегенерацию оценивали с помощью Fluoro Jade В окрашивания.

У животных высоковозбудимой линии генерализованная реакция развивается к 7 дню после стресса: число микроглиальных клеток у стрессированных животных значимо выше по сравнению с контролем во всех зонах гиппокампа. Кроме того, у стрессированных высоковозбудимых животных через 1 день после стресса число дегенерирующих нейронов в префронтальной коре значимо выше, чем в контроле. К 7 дню данный эффект стресса исчезает. Влияние стресса на выраженность нейродегенерации у низковозбудимых животных обнаружено на 7 день после стресса. Таким образом, у животных с контрастной возбудимостью нервной системы наблюдается разная динамика в развитии постстрессорного нейровоспаления и нейродегенерации.

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОЛОГИИ И СИНАПТИЧЕСКОЙ ДИСФУНКЦИИ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА *IN VITRO* ПРИ ПОМОЩИ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В НЕЙРОНЫ

Н. А. Красковская^{1, 2, *}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: ninakraskovskaya@gmail.com

Многие патологические признаки нейродегенеративных заболеваний, такие как развитие синаптической дисфункции, проявляются с возрастом. Прямое репрограммирование позволяет сохранить возраст индуцированных нейронов. Однако низкая эффективность методов прямого репрограммирования ограничивает их использование в качестве инструмента для моделирования нейродегенеративных заболеваний. В настоящем исследовании мы модифицировали микроРНК, факторы транскрипции и малые молекулы на основе протокола прямого перепрограммирования (Richner et al., 2015) и получили гомогенную популяцию индуцированных средних шипиковых нейронов (иСШН), наиболее уязвимого типа клеток при болезни Хантингтона (БХ) из дермальных фибробластов с эффективностью более 80%. В конце процедуры перепрограммирования иСШН положительно окрашиваются на канонические нейронные маркеры и реагируют на стимуляцию хлоридом калия и глутаматом. Индуцированные возбуждающие нейроны (иВН) также могут быть получены из первичных фибробластов для изучения патогенеза когнитивных нарушений, наблюдаемых при БХ. Кроме того, иМСН и иВН способны образовывать синаптические связи, что позволяет изучать дефекты синаптической передачи при развитии патологии БГ. Кроме того, в полученных нейронах от пациентов с БХ могут быть детектированы агрегаты мутантного белка хантингтина. Таким образом, модифицированный протокол позволяет получить однородную популяцию иМСН и иВН. Этот протокол может быть полезен как для изучения молекулярных и клеточных основ патогенеза БХ и открытия лекарств, так и для разработки персонализированного подхода к терапии.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1063).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Richner M., Victor M.B., Liu Y., Abernathy D., Yoo A.S. 2015. MicroRNA-based conversion of human fibroblasts into striatal medium spiny neurons. Nat Protoc. V. 10. P. 1543.

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ КЛЕТОК РС12 И КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Л. С. Крылова^{1, *,} Ю. А. Власова^{1,} Л. Б. Гайковая¹

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: lorywing@yandex.ru

Цитохром С является одним из подвижных компонентов дыхательной цепи митохондрий, поэтому наиболее подвержен изменениям, происходящим при нарушении их функции.

Цель. Изучить влияние окислительного стресса на активность цитохрома С в клетках РС12 и в клетках крови пациентов с нейродегенеративными заболеваниями.

Материалы и методы. Опыты проводили на культуре клеток РС12 (АТСС) и на лимфоцитах крови. Индуктором окислительного стресса (ОС) служила H_2O_2 (0.5 мМ). Активность фермента определяли спектрофотометрически. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием *t*-критерия.

Результаты. При инкубации РС12 и клеток крови контрольной группы с H_2O_2 происходило снижение активности цитохрома С на треть от исходной. Исходная активность фермента в крови пациентов с нейродегенеративными заболеваниями была в 3.5 раза ниже по сравнению с исходной у контрольной группы. При индукции ОС изменений в активности цитохрома С не наблюдалось.

Выводы. В присутствии H_2O_2 происходит достоверное снижение активности цитохрома С в мононуклеарах периферической крови (добровольцы) и в РС12. В мононуклеарах крови пациентов с нейродегенеративными заболеваниями уровень активности цитохрома С ниже, чем у здоровых добровольцев, и не изменялся в условиях ОС.

НАРУШЕНИЯ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ ПРИ СПИНОЦЕРЕБЕЛЛЯРНОЙ АТАКСИИ ВТОРОГО ТИПА

К. С. Маринина^{1,*}, А. П. Егорова¹

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

*E-mail: ks.marinina@mail.ru

В последнее время классические представления о мозжечке как об отделе головного мозга, ответственного исключительно за координацию и регулирование процессов исправления ошибок движения, отходят на второй план. Немалый массив исследований подтверждает вовлеченность мозжечка в более сложные схемы работы мозга, затрагивающие когнитивные, ассоциативные и социальные паттерны поведения (Timmann et al., 2010). Новое видение принципов функционирования данного отдела накладывает необходимость в новом подходе к исследованиям связанных с ним нейродегенеративных заболеваний. Мозжечковая атаксия относится к группе редких заболеваний, характеризующихся нейродегенерацией структур мозжечка и его путей, приводящей в первую очередь к двигательным и координационным нарушениям у пациентов, но нередко основные симптомы дополняются выраженными когнитивными дисфункциями. На мышинной модели заболевания группа Мелани Марк продемонстрировала, что мыши с эпизодической атаксией второго типа (EA2), помимо двигательных аномалий, также демонстрируют недостатки социального поведения, проблемы с принятием решений, нарушения памяти и обучения, повышенную тревожность и депрессию (Bohne et al., 2021). Схожие результаты были получены Ашер и соавторами при исследовании прогрессирующей спиноцеребеллярной атаксии первого типа (СЦА1) (Asher et al., 2020, 2021).

Наша исследовательская группа сосредоточилась на изучении наличия когнитивных нарушений у мышей, моделирующих спиноцеребеллярную атаксию 2-го типа – СЦА2. Для исследования когнитивных симптомов был проведен ряд поведенческих тестов, а именно, тест на оценку пространственной ориентации – водный лабиринт Мориса, тест на двигательную активность и эмоциональную реактивность – “открытое поле”. Также мы оценили уровень тревожности и депрессии у грызунов в тестах “принудительное плавание”, “подвешивание за хвост” и “тест предпочтения сахарозы”. Оценка моторных нарушений проводили с помощью теста “прогулка по перекладке”. Результаты показали наличие когнитивных нарушений у мышей с СЦА2 относительно их однопометников без заболевания.

Немоторные проявления заболевания при мозжечковой атаксии часто предшествуют более характерным моторным нарушениям и могут существенно дополнить клинический подход в диагностике и разработке стратегий лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Asher M., Rosa J.G., Rainwater O., Duvick L., Bennyworth M., Lai R.Y., Kuo S.-H., Cvetanovic M. 2020. Cerebellar contribution to the cognitive alterations in SCA1: evidence from mouse models. Hum. Mol. Genet. V. 29. P. 117.

Asher M., Rosa J.G., Cvetanovic M. 2021. Mood alterations in mouse models of Spinocerebellar Ataxia type 1. Sci. Rep. V. 11: 713.

Bohne P., Mourabit D.B., Josten M., Mark M.D. 2021. Cognitive deficits in episodic ataxia type 2 mouse models. Hum. Mol. Genet. V. 30. P. 1811.

Timmann D. et al. 2010. The human cerebellum contributes to motor, emotional and cognitive associative learning. A review. Cortex. V. 46. P. 845.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ АГЕНТОВ НА КЛЕТКИ КРОВИ И АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ГИППОКАМПА У ВЗРОСЛЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ ВТВР И С57BL/6

А. С. Мутовина^{1,2,*}, К. А. Айриянц², В. В. Решетников², Ю. А. Рябушкина², Ю. Н. Хантакова², Н. П. Бондарь²

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: a.mutovina@g.nsu.ru

Расстройство аутистического спектра (РАС) – это заболевание нейроразвития, характеризующееся поведенческой диадой: нарушенным социальным поведением и стереотипией. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что иммунные процессы играют ключевую роль в патофизиологии РАС. Одна из самых валидных животных моделей расстройства – мыши линии ВТВР Т +Itpr3tf/J (ВТВР) – не только демонстрируют аутизм-подобный фенотип, но также имеют аналогичные наблюдаемым у больных нарушения в иммунной системе. Тем не менее, иммунный ответ на индуцированное воспаление у этих мышей все еще плохо изучен. Поэтому мы оценили различия в иммунной функции у взрослых самцов мышей ВТВР и

C57Bl/6 (B6) (общепринято используются в качестве контроля) в норме и после индукции острого вирусного и бактериального воспалений.

Мышам линий BTBR и B6 внутрибрюшинно вводили либо липополисахарид (LPS, 50 мкг/кг), либо полиинозиновую:полицитидиловую кислоту (Poly I:C, 10 мкг/кг), или их комбинацию. Контрольные животные получали эквивалентные объемы физиологического раствора. Иммунофенотипирование лимфоцитов крови и гематологический анализ проводили через 16 ч после инъекции, также были оценены уровни экспрессии *c-Fos*, *Gfap* и *Aif1* в гипоталамусе.

В норме мышцы BTBR имели одинаковый уровень лейкоцитов с животными линии B6, но количество Т-клеток, особенно CD4+, было повышено, а количество В-клеток и CD8+ было снижено относительно B6. После инъекции LPS в общем анализе крови увеличивалось количество гранулоцитов и уменьшалось количество лимфоцитов у мышей B6, но не у BTBR. Введение Poly I:C вызывало лейкопению у мышей B6 и не изменяло количество клеток у BTBR. Однако в обеих линиях уменьшение CD8+ лимфоцитов и увеличение CD4+ лимфоцитов указывает на острую фазу воспаления. Так, мыши BTBR продемонстрировали ослабленный иммунный ответ на бактериальный и вирусный миметик по сравнению с мышами B6, комбинация LPS и Poly I:C не приводила к усилению ответа.

Анализ уровня экспрессии маркера активации нейронов *c-Fos* показал, что введение провоспалительных агентов не оказывает влияние на этот параметр. Уровень экспрессии гена маркера активации астроцитов *Gfap* не изменялся после индукции воспаления. Также мы оценили экспрессию гена *Aif*, увеличение которого указывает на микроглиальную активацию. Мыши линии BTBR демонстрировали сниженную экспрессию этого гена как до, так и после введения провоспалительных агентов; но сочетанное введение LPS и Poly I:C приводило к увеличению транскрипта данного гена. У животных линии B6 увеличение уровня мРНК *Aif* наблюдалось после введения LPS и Poly I:C по отдельности.

Таким образом, Poly I:C оказывает более выраженное влияние на иммунный ответ и активность клеток гипоталамуса у животных обеих линий. Было показано, что животные линий BTBR и B6 по-разному реагируют на индукцию острого воспаления.

ПРОИЗВОДНЫЕ ДИТИАДИАЗОЛОВ КАК НОВЫЕ МОДУЛЯТОРЫ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

Ю. В. Новикова^{1,*}, Д. А. Грехнев¹, В. Н. Юсковец², Н. М. Чернов², И. П. Яковлев²,
В. А. Вигонт¹, Е. В. Казначеева¹

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

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

*E-mail: julynovik2000@gmail.com

Кальциевая сигнализация является значимым инструментом клетки, благодаря которому происходит регуляция важных клеточных процессов, например, таких как пролиферация, экзоцитоз, экспрессия генов, апоптоз и т.д. Функционирование такой непростой системы становится возможным с помощью особой системы кальциевого гомеостаза, объединяющей в себе эндоплазматический ретикулум, митохондрии, кальций-связывающие белки, кальциевые обменники и каналы. Вход кальция через депо-управляемые каналы является одним из наиболее общих типов притока кальция в клетку, активность такого входа в экспериментальных условиях чаще всего вызывается аппликацией тапсигаргина – антагониста кальциевой помпы эндоплазматического ретикулума SERCA.

Аномальная кальциевая сигнализация была обнаружена при многих заболеваниях, в том числе, сердечно-сосудистых и онкологических. Во многих статьях также отмечается нарушение кальциевой сигнализации при различных нейродегенеративных патологиях. Таким образом, поиск новых модуляторов кальциевой сигнализации, способных корректировать нарушения кальциевого гомеостаза, является крайне актуальной задачей. Такие вещества могут в дальнейшем послужить как новое лекарственное средство или использоваться в качестве инструментов для изучения молекулярных механизмов кальциевой сигнализации в норме и патологии.

В результате первичного скрининга ряда малых молекул синтетического происхождения, проведенного с использованием флуоресцентного кальциевого зонда Fluo-4AM, была отмечена способность вещества VN193, принадлежащего к классу дитиadiaзолов, в концентрациях 1–100 мкМ при инкубации в течение 20 мин перед экспериментом ингибировать тапсигаргин-индуцированный кальциевый ответ в клетках линии HEK293.

В дальнейших экспериментах с флуоресцентным кальциевым зондом FURA-2AM мы обнаружили, что содержание кальция в депо клеток, предобработанных VN193, достоверно ниже, чем в контрольных клетках. Также было подтверждено существенное снижение тапсигаргин-индуцированного входа кальция в клетки,

в том числе был продемонстрирован ингибирующий эффект VN193 в отношении депо-управляемого входа кальция сразу после добавления вещества в омывающий клетки раствор.

Результаты экспериментов позволили нам предположить, что VN193, возможно, является новым ингибитором депо-управляемых кальциевых каналов. Однако данная гипотеза требует дальнейших исследований и проверки, в том числе с использованием электрофизиологических методов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021) и РФФИ (проект № 22-14-00218).

ВЛИЯНИЕ НИЗКО-ИНТЕНСИВНОГО ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РЕПАРАЦИЮ ДНК В ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ПАЦИЕНТОВ С АТАКСИЕЙ-ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИЕЙ И СИНДРОМОМ КОККЕЙНА

А. В. Ноздрачева^{1,*}, Н. М. Плещач², М. Л. Куранова²

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

²*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: shurupchi@mail.ru*

Ионизирующее излучение (ИИ), такое как рентгеновское или γ -излучение, является неизбежным фактором риска для здоровья человека. ИИ может вызывать различные повреждения ДНК, среди которых двуни-тевые разрывы (ДР) считаются наиболее опасными, представляя основную угрозу целостности и стабильности генома и являясь основными факторами, определяющими клеточную судьбу после воздействия ИИ (Khanna et al., 2001). Эволюционно сохраненные пути репарации ДНК играют критическую роль в противодействии ДР для обеспечения целостности и поддержания стабильности генома. Генетические нарушения в путях репарации ДНК могут вызывать геномную нестабильность и повышать риски для здоровья, вызванные ИИ.

Несмотря на не угасающий интерес к процессу восстановления ДНК после повреждения, вопрос возможных стимуляции и улучшения работы репарационных систем клетки является актуальным. ИИ обычно принято рассматривать, как повреждающий агент, однако, описан стимулирующий репарацию ДНК эффект при низкоинтенсивной радиации (Osipov et al., 2015; Janiak et al., 2017).

Целью данного исследования является изучение влияния ИИ низкой интенсивности на процессы репарации ДНК в дермальных фибробластах человека здорового донора и пациентов с нарушениями процессов репарации ДНК (пациенты с атаксией-телеангиэктазией и синдромом коккейна) при помощи изучения методом непрямой иммунофлуоресценции изменения разных параметров (количества, интенсивности флуоресценции, площади) фокусов репарационного белка MRE11A и белка ki67, связанного с пролиферацией, через определенные промежутки времени (30 мин, 1,5, 6 и 24 ч) после облучения ионизирующим излучением (на установке РАП-150/300-14) в дозах 0.3 Гр и 2 Гр, а также после повторного облучения в дозе 2 Гр через сутки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Khanna K.K., Jackson S.P. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*. V. 27. P. 247.

Janiak M.K., Wincenciak M., Cheda A., Nowosielska E.M., Calabrese E.J. 2017. Cancer immunotherapy: how low-level ionizing radiation can play a key role. *Cancer Immunol. Immunother.* V. 66. P. 819.

Osipov A.N., Grekhova A., Pustovalova M., Ozerov I.V., Eremin P., Vorobyeva N., Lazareva N., Pulin A., Zhavoronkov A., Roumiantsev S., Klokov D., Eremin I. 2015. Activation of homologous recombination DNA repair in human skin fibroblasts continuously exposed to X-ray radiation. *Oncotarget*. V. 6. P. 26876.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕАЛИЗАЦИИ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ БЕЛКА GRP78 В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС

М. Б. Пази^{1,*}, И. В. Екимова¹

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: pazimariia@gmail.com*

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) — хроническое неизлечимое нейродегенеративное заболевание. В основе патогенеза БП лежит агрегация и образование токсичных олигомеров белка α -синуклеина, которые накапливаются в цитозоле и просвете эндоплазматического ретикулума (ЭР), что является триггером развития стресса ЭР. Активация стресса ЭР, особенно его PERK-зависимого проапоптозного пути, показаны в

исследованиях *postmortem* у пациентов с БП. Шаперон ЭР Grp78 препятствует неправильной конформации белков и индукции стресса ЭР, что может играть роль в защите клеток от гибели. Снижение экспрессии Grp78 с возрастом и во время БП рассматривается как фактор, предрасполагающий к развитию заболевания. Ранее нами показано, что терапия с экзогенным Grp78, введенным интраназально, препятствует развитию нейродегенерации и нейровоспаления в компактной части черной субстанции (кЧС) в модели БП у животных. Целью данного исследования было выяснить, приводит ли терапия с Grp78 к ослаблению признаков α -синуклеиновой патологии и ингибированию активности PERK-зависимого проапоптозного каскада стресса ЭР в нигростриатной системе в модели доклинической стадии БП у крыс.

Методы. Модель БП была создана с использованием инъекций ингибитора протеасом лактацистина (ЛЦ) в кЧС самцам крыс Вистар (7 мес.). Grp78 вводился интраназально дважды после ЛЦ и через неделю после его последней инъекции. Контрольная группа животных получала растворитель Grp78. Для анализа патоморфологических и нейрохимических изменений применяли методы иммуногистохимии и биохимии. Статистический анализ данных осуществлялся с помощью параметрического анализа ANOVA с последующим Sidak post-hoc.

Результаты. Модель БП характеризовалась нейродегенерацией и нейровоспалением в нигростриатной системе, развитием α -синуклеиновой патологии и активацией PERK-зависимой проапоптотической ветви стресса ЭР в кЧС. В исследовании показано увеличение в кЧС содержания эффекторных каспаз апоптотической ветви ЭР стресса: активированных каспазы-9 и каспазы-3. Терапия Grp78 ослабляла нейродегенерацию и нейровоспаление, препятствовала развитию α -синуклеиновой патологии, развитию ЭР стресса и апоптоза.

В работе изучены компенсаторные процессы, направленные на поддержание функционального состояния нигростриатной системы при нейродегенерации. Показано, что в модели БП нейродегенерация сопровождалась увеличением количества дофаминовых (ДА) D2 рецепторов в дорзальном стриатуме и кЧС, вероятно, из-за усиления регуляции постсинаптических D2-рецепторов. Также было выявлено увеличение содержания нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), который повышает выживаемость ДА-ергических нейронов и улучшает ДА-ергическую трансмиссию в животных моделях БП. Введение Grp78 не препятствовало развитию этих адаптивных ответов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта на создание и развитие НЦМУ “Павловский центр “Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости” (№ 075-15-2020-916 от 13.11.2020).

ДИНАМИЧЕСКИЕ ТУБУЛИНОВЫЕ МИКРОТРУБОЧКИ РЕГУЛИРУЮТ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ И ЛОКАЛИЗАЦИЮ ШИПИКОВОГО АППАРАТА В ДЕНДРИТНЫХ ШИПИКАХ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ

Е. И. Пчицкая^{1,*}, А. В. Раковская¹, И. Б. Безпрозванный^{1,2}

¹Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

²Кафедра физиологии, Юго-Западный медицинский центр Университета штата Техас, Даллас, США

*E-mail: pchitskaya_ei@spbstu.ru

В головном мозге синапс со стороны дендрита формируется при помощи дендритного шипика – специализированного выроста нейрональной мембраны. Изучение процессов, обеспечивающих функционирование синапсов, а также изменение их формы и свойств, является особенно актуальным в свете широкой распространенности различных психических и нейродегенеративных заболеваний, связанных с нарушениями в морфологии и пластичности синапсов в различных отделах головного мозга. Пластичность синаптического контакта в значительной мере определяется сложными процессами кальциевого сигналинга. Одним из механизмов кальциевого сигналинга в нейроне является депо-управляемый вход кальция (ДУВК), который активируется при снижении концентрации кальция во внутриклеточном кальциевом депо – гладком эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Располагающийся на мембране эндоплазматического ретикулума белок-кальциевый сенсор STIM (stromal interacting molecule) при опустошении кальциевого депо транслоцируется к клеточной мембране, где формирует кластеры и запускает вход кальция в нейрон путем взаимодействия с кальций-проводящими каналами. Нарушение депо-управляемого входа кальция обнаружено при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и болезни Хантингтона. Известно, что в электроневозбудимых клетках белок EB1 (end-binding), который крепится к положительному концу растущей тубулиновой микротрубочки и мигрирует вместе с ним, контролирует транслокацию STIM1 к местам контакта ЭР и клеточной мембраны, его олигомеризацию и движение ЭР в клетке. Ранее было показано, что гомолог STIM2, специфичный для зрелых дендритных шипиков, взаимодействуют с белком EB3, и данное взаимодействие важно для фор-

мирования грибовидных дендритных шипиков. Тем не менее, отсутствует информация о роли взаимодействия с EB белками в кластеризации STIM2 и движении ЭР в нейронах. Полученные в ходе данного исследования данные продемонстрировали, что нарушение взаимодействия STIM2-EB3 путем внесения мутаций в сайт связывания, приводит к исключению STIM2 из дендритных шипиков гиппокампальных нейронов *in vitro* в нормальных условиях, а также блокирует его транслокацию в шипики и олигомеризацию при опустошении кальциевого депо. В ходе исследования была произведена оценка наличия шипикового аппарата (spine apparatus) – формируемой эндоплазматическим ретикуломом специализированной нейрональной органеллы в дендритных шипиках гиппокампальных нейронов в норме и при разрушении комплекса белков STIM2-EB. Для этого проводилось иммуноцитохимическое окрашивание первичных гиппокампальных нейронов антителами к маркерному белку ША синаптоподину. Нарушение взаимодействия STIM2-EB3 приводит к значительному снижению числа дендритных шипиков содержащих шипиковый аппарат. Таким образом, впервые продемонстрировано, что взаимодействие STIM2 и EB3 участвует в транслокации и олигомеризации STIM2 и движении эндоплазматического ретикула в дендритах гиппокампальных нейронов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-74-00028).

ТУБУЛИНОВЫЕ МИКРОТРУБОЧКИ РЕГУЛИРУЮТ КЛАСТЕРИЗАЦИЮ БЕЛКОВ STIM

А. В. Раковская^{1,*}, Е. И. Пчицкая¹, И. Б. Безпрозванный^{1, 2}

¹Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия

²Кафедра физиологии, Юго-Западный медицинский центр Университета штата Техас, Даллас, США

*E-mail: jonatepl@gmail.com

Одним из механизмов кальциевого сигналинга в клетке является депо-управляемый вход кальция (ДУВК) (Zhang et al., 2016). ДУВК из внеклеточной среды в цитоплазму активируется при снижении концентрации кальция во внутриклеточном кальциевом депо – гладком эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Во время истощения запасов белки STIM образуют кластеры как часть механизма инициации входа кальция в цитоплазму. ДУВК в дендритных шипиках нейронов гиппокампа регулируется белком STIM2, и ранее было показано, что этот путь нарушен в различных мышиных моделях болезни Альцгеймера (Wegierski, Kuznicki, 2019). STIM2 образует Ca²⁺-зависимый комплекс с белком EB3 через аминокислотный мотив Ser-x-Phe-Pro. Недавние исследования показали, белок семейства EB3 крепится к положительному концу растущей тубулиновой микротрубочки (MT), которые временно входят в дендритные шипики. В нейронах гиппокампа взаимодействие STIM2-EB3 важно для нормальной морфологии дендритных шипиков (Pchitskaya et al., 2017). Известно, что белок EB1 контролирует транслокацию STIM1 к местам контакта ЭР и клеточной мембраны. Сравнительное исследование влияния EB белков на кластеризацию белков-гомологов STIM1 и STIM2 в зависимости от концентрации кальция в ЭР ранее не проводилась. Целью данной работы является анализ размера и плотности кластеров, формируемых белками STIM1/2 и их вариантами STIM2-IP/NN, STIM1-TR/NN с мутацией в сайте взаимодействия с EB белками в клетках HEK293T. Для изучения кластеров белков STIM был применен метод экспансионной микроскопии, позволяющий значительно увеличить разрешение в сравнении с обычной конфокальной микроскопией и визуализировать кластеры на мембране. Клетки HEK293T с конфлюэнтностью 50–70% трансфицировали плазмидами mCherry-STIM1, mCherry-STIM1-IP/NN, YFP-STIM2, YFP-STIM2-IP/NN, фиксировались и затем окрашивались первичными антителами к белку GFP или mCherry и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa Fluor 488 или 564, для усиления интенсивности флуоресценции. При опустошении кальциевого депо плотность и размер кластеров белка STIM1-TR/NN значительно увеличивается по сравнению с кластерами STIM1. При снижении концентрации кальция в ЭР у мутантного варианта белка STIM2-IP/NN присутствует тенденция к снижению плотности кластеров по сравнению со STIM2. На основании полученных данных можно сделать вывод, что для формирования кластеров белку STIM2 необходимо взаимодействие с MT, через связь с EB-белками, в то время как ассоциация с EB белками ограничивает кластеризацию белка STIM1.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-74-00028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Pchitskaya E. et al. 2017. Stim2-Eb3 association and morphology of dendritic spines in hippocampal neurons. *Sci. Rep.* V. 7: 17625.

Wegierski T., Kuznicki J. 2018. Neuronal calcium signaling via store-operated channels in health and disease. *Cell Calcium.* V. 74. P. 102.

Zhang H. et al. 2016. Store-operated calcium channel complex in postsynaptic spines: A new therapeutic target for Alzheimer's disease treatment. *J. Neurosci.* V. 36. P. 11837.

ВЛИЯНИЕ АГОНИСТА PPAR γ НА ЭКСПРЕССИЮ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ У КРЫСА. И. Рогинская^{1,*}, А. А. Коваленко¹, О. Е. Зубарева¹¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: roganna5500@gmail.com

Эпилепсия – хроническое неврологическое заболевание, характеризующееся развитием спонтанных рецидивирующих судорог и различных когнитивных и психоэмоциональных нарушений. Около 30% больных эпилепсией не поддаются лечению традиционно используемыми препаратами, что делает актуальным поиск новых методов терапии. В последнее время активно обсуждается роль в патогенезе различных нейропатологий, включая эпилепсию, ядерных транскрипционных факторов – рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPARs). Целью данной работы явилось изучение влияния агониста PPAR γ пиогли тазона (PG) на развитие ряда патологических процессов в литий-пилокарпиновой (Pilo) модели височной эпилепсии.

Особенностью данной модели является то, что после острых судорог, вызванных введением Pilo, у крыс постепенно развивается хроническая эпилептизация мозга. Эксперименты выполнены на крысах самцах Wistar в возрасте 7–8 нед. Экспериментальным животным вводили раствор LiCl (в/б, 127 мг/кг), затем спустя 24 ч метилскополамин (в/б, 1 мг/кг), через 30 мин – пилокарпин (в/б, 20–30 мг/кг, по 10 мг/кг до достижения выраженных судорог). Контрольным крысам пилокарпин не вводили. PG вводили в/б курсом: первая инъекция в дозе 7 мг/кг производилась через 75 мин после пилокарпин-индуцированного эпилептического статуса и затем, по 1 мг/кг, 1 раз в день, с интервалом 24 ч, в течение 7 дней. На 6 и 7 сут поведение животных тестировали с использованием методик “Открытое поле” и “Социальный тест”. Забор образцов мозга осуществляли на 8 сутки после эпилептического статуса. Экспрессию генов белков, вовлеченных в патогенез эпилепсии: провоспалительных цитокинов (интерлейкина-1 β – *Il1b*, фактора некроза опухоли альфа – *Tnfa*), Nod-подобного рецепторного белка 3 (*Nlrp3*), микроглиального белка аллотрансплантатного воспалительного фактора 1 (IBA1, ген *Aif1*), переносчика глутамата (*Eaat2*) и показателя активации астроцитов (*Gfap*) определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени в дорзальном гиппокампе и височной коре.

Выявлено, что PG ускорял восстановление веса животных, сниженного после введения Pilo, подавлял гиперактивность и нивелировал нарушения коммуникативного поведения экспериментальных крыс. У животных, перенесших судороги, в дорзальном гиппокампе усиливалась экспрессия генов *Tnfa*, *Nlrp3* и *Aif1*. Введение PG нивелировало эти нарушения, однако оно не влияло на Pilo-индуцированное увеличение продукции мРНК *Aif1* в височной коре и на усиление экспрессии *Gfap* в дорзальном гиппокампе и височной коре.

Таким образом, PG показал высокую эффективность в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии, что позволяет рассматривать его как перспективный препарат для клинических исследований.

РОЛЬ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В ПРО-НОЦИЦЕПТИВНОМ ДЕЙСТВИИ ОКСИДА АЗОТА В АФФЕРЕНТАХ ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА КРЫСЫС. О. Свитко¹, А. Д. Буглинина¹, Д. А. Нурмиева¹, И. Ф. Шайдуллов¹, К. С. Королёва^{1,*}, Г. Ф. Ситдикова¹¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: k.s.koroleva@yandex.ru

Оксид азота (NO), наряду с монооксидом углерода и сероводородом, представляет собой небольшую газообразную сигнальную молекулу, участвующую в различных биологических процессах, где одна из основных его функций заключается в регуляции тонуса сосудов. Известно, что нитроглицерин, донор NO, является триггером мигрени и широко используются для моделирования мигрени, как у человека, так и у животных, что предполагает участие компонентов сигнального каскада NO в патогенезе мигрени. Однако, нейрональные механизмы участия NO в развитии мигрени практически не изучены. В связи с этим целью данной работы является определение роли циклических нуклеотидов, цГМФ и цАМФ, в про-ноцицептивном действии NO в афферентах тройничного нерва крысы. Эксперименты проводились на самцах (4–8 нед.) крыс линии Wistar. В работе использовали электрофизиологический метод регистрации потенциалов действия (ПД) тройничного нерва, иннервирующего твердую мозговую оболочку в препарате полочерепа крысы. Экзогенный донор NO, нитропруссид натрия (SNP), в концентрации 200 мкМ достоверно увеличивал частоту ПД (в контроле частота ПД составила 260.4 ± 64.8 ПД за 5 мин; к 10 мин инкубации в растворе с SNP – 532.7 ± 84.8 ПД к 15 мин инкубации ($p < 0.05$; $n = 4$)). Для выявления роли гуанилатциклазы в эффектах NO использовали ингибитор ODQ (10 мкМ). Инкубация препарата в ODQ в течение 20 мин не приводила к изменениям частоты ПД. Базовая частота ПД в тройничном нерве составила 187.5 ± 86.2 ПД за 5 мин и 172.5 ± 30.1 ПД за

5 мин после 20 минутной инкубации в ODQ (10 мкМ) ($n = 4; p > 0.05$). Последующее добавление донора NO, SNP (200 мкМ) не вызывало достоверного изменения частоты ПД и к 10 мин аппликации частота ПД составила 145.2 ± 47.3 ПД за 5 мин и к 15 мин 129.7 ± 50.8 ПД за 5 мин; 20 мин 127.1 ± 40.3 ПД за 5 мин. Для выявления роли аденилатциклазы в эффектах NO использовали ингибитор MDL 12330A (5 мкМ). MDL 12330A также не оказывал влияния на частоту ПД действия ($n = 4$), в контроле частота ПД составила 148.3 ± 72.6 ПД за 5 мин и 115.2 ± 63.1 ПД за 5 мин после 20 минутной инкубации в MDL 12330A ($n = 4; p > 0.05$). Последующее добавление SNP (200 мкМ) приводило к достоверному увеличению частоты ПД к 15 мин (302.3 ± 48.7 ПД за 5 мин; $n = 4; p < 0.05$). Таким образом, основной мишенью экзогенного оксида азота в афферентах тройничного нерва является растворимая гуанилатциклаза, активация которой может приводить к синтезу цГМФ и к усилению активности протеинкиназы G, способной фосфорилировать ионные каналы и рецепторы, а также к усилению высвобождению CGRP из пептидергических нервных окончаний. Полученные данные вносят вклад в понимание нейрональных механизмов участия NO в патогенезе мигрени и обосновывают возможность использования блокаторов NO для купирования боли при остром приступе мигрени.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-75-00042).

ПОИСК САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛИГАНДОВ И ПРЕДСКАЗАНИЕ ИХ ЭФФЕКТА НА АМИЛОИДНУЮ КОНВЕРСИЮ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

П. И. Семенюк*

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

*E-mail: psemenyuk@belozersky.msu.ru

Нейродегенеративные заболевания человека, такие как болезни Паркинсона и Альцгеймера и другие амилоидозы, связаны с изменением конформации и последующей амилоидоподобной агрегации природно-развернутых белков с образованием амилоидных фибрилл. Для поиска антиамилоидных агентов важно понимать механизм взаимодействия потенциальных лигандов с амилоидогенным белком и влияние связывания на амилоидную трансформацию и последующую агрегацию. При этом в большинстве случаев провести классический докинг не представляется возможным, поскольку лиганд должен связывать нативную форму природно-развернутого белка. В случае альфа-синуклеина, играющего ключевую роль в развитии болезни Паркинсона, задача осложняется размером белка – порядка 140 аминокислотных остатков, причём на склонность к фибриллизации влияют остатки, не входящие в так называемый NAC-домен, который считается достаточным для образования фибрилл.

В данном проекте мы создали модель *in silico* для предсказания амилоидной конверсии альфа-синуклеина в присутствии низкомолекулярных лигандов. С использованием симуляций молекулярной динамики с обменом репликами по температуре удалось предсказать сайты связывания лигандов с хорошим совпадением с данными, полученными с помощью экспериментальных методов. При этом были выбраны как лиганды, обладающие анти-амилоидной активностью (такие как фасудил и фталоцианины), так и индуцирующие фибриллизацию молекулы (спермин), что сделало возможным не только поиск участка связывания, но и оценка эффекта связывания на амилоидную агрегацию.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-74-00069).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К НИКОТИНОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ У КРЫС, ПЕРЕЖИВШИХ ПРЕНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ

В. А. Стратиллов^{1,*}, О. В. Ветровой^{1,2}, Е. И. Тюлькова¹, Е. В. Ломерт³

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: stratilov.v@icloud.com

Основная проблема нейробиологии аддикций заключается в отсутствии понимания причин широкой вариативности индивидуальной предрасположенности к зависимостям. Накоплен существенный массив информации о наследственных факторах риска развития аддикций. Кроме того, анамнезы пациентов указывают на существенный вклад ненаследственных неблагоприятных факторов внешней среды, оказывающих свое влияние в период перинатального онтогенеза, в частности гипоксии плода и стресса матери.

В рамках настоящей работы на крысах нами была проведена оценка роли пренатальной гипоксии (ПГ) в формировании предрасположенности к никотиновой зависимости во взрослом возрасте.

Крысы, пережившие ПГ на 14–16 сут эмбрионального развития, во взрослом возрасте отличаются повышенной предрасположенностью к потреблению никотина в условиях свободного выбора, а также после хронического потребления никотина в отличие от контрольных животных демонстрируют признаки выраженной зависимости и синдрома отмены. В прилежащем ядре стриатума (NAc) ПГ крыс выявлено увеличение фосфорилирования активируемого дофамином и супрессируемого глутаматом белка DARPP-32 при отсутствии изменений количества дофамина и дофаминовых рецепторов 1-го типа. В совокупности с данными об экспрессии генов ферментов метаболизма глутамата и чувствительных к никотину холинергических рецепторов *chrna7* в иннервирующих мезолимбическую систему глутаматергических структурах мозга и результатами иммунофлуоресцентного картирования глутаматергических проекций в вентральной тегментарной области (VTA) и NAc ПГ крыс, эти данные свидетельствуют о нарушении глутаматной регуляции мезолимбической системы вследствие ПГ как на уровне NAc (ослабление), так и на уровне VTA (усиление), что вероятно и предопределяет ассоциированную с пренатальной гипоксией склонность к никотиновой зависимости.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-315-90003).

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ АСТРОЦИТОВ И КАЛЬЦИФИКАТОВ В ЭПИФИЗЕ ЧЕЛОВЕКА

Д. А. Суфиева^{1, *}, Е. А. Федорова¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: dinobrione@gmail.com

Эпифиз представляет собой непарную эндокринную железу, которая является основным источником гормона мелатонина в организме, и играет важную роль во взаиморегуляции эндокринных желез. Основными клетками эпифиза, секретирующими гормон мелатонин, являются пинеалоциты. В паренхиме также локализируются глиальные клетки (астроциты и микроглия) и тучные клетки. Кроме того, эпифиз может содержать кальцификаты (он же мозговой песок, *corpora arenacea*). Это образования округлой или овальной формы, состоящие из солей кальция, магния, аммония. Было показано, что количество и размеры кальцификатов увеличиваются с возрастом. Однако роль этих образований и взаимодействие с другими клеточными элементами в эпифизе до сих пор остаются не изученными. Целью настоящего исследования стало проанализировать взаимоотношения кальцификатов и астроцитов эпифиза головного мозга человека.

Материалом для исследования служили образцы эпифиза мужчин и женщин возрастом от 16 до 81 года ($n = 13$). Для иммуногистохимического исследования были использованы антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (Daко, Дания). Визуализацию продукта реакции осуществляли с помощью 3,3-диаминобензидина (набор DAB+, Дако, Дания). Для световой микроскопии, часть срезов подкрашивали гематоксилином Эрлиха. Для флуоресцентной микроскопии применяли ослиные антитела против иммуноглобулина кролика, конъюгированных с флуорохромом RRX (Jackson ImmunoResearch, США). Препараты анализировали с использованием микроскопов Leica DM750 и Zeiss LSM 800.

При изучении астроцитов было показано, что у лиц молодого и среднего возраста тела этих клеток небольшие, отростки длинные и сильно разветвленные и, как правило, оканчиваются на кровеносных сосудах. Астроциты внутри органа распределяются равномерно, преимущественно внутри долек эпифиза, в трабекулах встречаются редко. Кальцификаты единичные, небольшие, имеют округлую форму. Астроциты оплетают отростками кальцификаты, формируя барьер от окружающей ткани. У лиц пожилого возраста тела астроцитов становятся крупнее, отростки толще и, в некоторых случаях, они могут формировать густую сеть. Астроциты распределены внутри псевдодоек неравномерно. Кальцификаты крупные, часто располагаются группами. Астроциты оплетают своими отростками либо одиночные кальцификаты, либо целые их группы, не изолируя отдельные кальцификаты друг от друга. Сама изолирующая прослойка становится толще с возрастом.

Полученные данные свидетельствуют о возрастной динамике в организации как кальцификатов, так и астроцитов, и об их тесном взаимодействии. Дальнейшие исследования в этом направлении помогут установить роль астроцитов в формировании собственной барьерной системы эпифиза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-20051, <https://rscf.ru/project/22-25-20051/>) и Санкт-Петербургского научного фонда (соглашение от 14.04.2022 г. № 47/2022).

СОДЕРЖАНИЕ мРНК SMIM20 В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС В ПЕРИОД ОТМЕНЫ АЛКОГОЛЯ**М. С. Толкмит^{1,*}, Р. Н. Давудова¹, С. О. Ереско^{2,4}, М. И. Айрапетов^{1,3}, П. Д. Шабанов³**¹*Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия*²*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*³*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*⁴*Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия***E-mail: mstolkmit@mail.ru*

Фениксины (PNX)-14 и -20 – нейрпептиды, открытые в 2013 году, образуются из белка SMIM20. В исследованиях последних лет появляются сведения в пользу того, что существует взаимосвязь между фениксинами и механизмами нейровоспаления, однако данные не обобщены.

Материалы и методы исследования: работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар ($n = 24$, в группе по 8 крыс). Моделирование алкоголизации осуществлялось посредством внутрижелудочного введения 20%-ного раствора этанола (2 г/кг) на протяжении 2 мес. По окончании опыта были произведены внутрибрюшинные инъекции рифампицина (100 мг/кг) на протяжении 7 сут. По окончании опытов на 10-е сут. отмены алкоголя забирались образцы структур головного мозга: медиальная префронтальная кора (mPFC), гиппокамп (HIP), прилежащее ядро (NAc). Контрольная группа животных получала инъекции эквивалентный объем физиологического раствора. Суммарная РНК получена с помощью Extract RNA (Евроген, РФ). ОТ выполнена посредством “MMLV RT kit” (Евроген, РФ). Реал-тайм ПЦР проводили в 25 мкл смеси, содержащей SYBR Green MIX (Евроген, Россия), смесь праймеров (BioBeagle, РФ). Данные были посчитаны методом $2\Delta\Delta CT$ и статистически обработаны.

Результаты и их обсуждение: длительная алкоголизация привела к снижению уровня мРНК SMIM20 в mPFC (в 2.24 раза, $p \leq 0.05$) и HIP (в 1.73 раза, $p \leq 0.05$) мозга крыс в период отмены алкоголя. При этом в NAc, напротив, уровень мРНК SMIM20 повысился (в 2.54 раза, $p \leq 0.05$). Нами были отобраны для исследования ключевые структуры головного мозга, дисфункции в котором наблюдаются при длительном и остром употреблении этанола в первую очередь. Учитывая наличие в литературе о наличии у пептидов фениксинов противовоспалительных свойств, изменение уровня экспрессии гена фениксинов (*Smim20*) может указывать нам о дисфункциях в тех механизмах, которые направлены на снижение уровня нейровоспалительного процесса. При этом изменений в содержании мРНК провоспалительных цитокинов IL1 β и IL6 не обнаружено ни в одной из исследуемых структур головного мозга. Возможно, наблюдаемый результат связан с тем, что к 10-му дню отмены алкоголизации нормализовалась экспрессия генов провоспалительных цитокинов IL1 β и IL6. Выполненные инъекции рифампицина не привели к статистически достоверным изменениям в содержаниях мРНК SMIM20.

ФОРМИРОВАНИЕ КОНТАКТОВ МЕЖДУ КЛАСТЕРАМИ БЕЛКА VCL-2 И КЛАСТЕРАМИ РЕЦЕПТОРА IP3 В МЫШИНЫХ ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ *IN VIVO***М. Е. Чиграй^{1,*}, А. В. Раковская¹, Е. И. Пчицкая¹, Т. Вервлиет², Г. Бултынк², И. Б. Безпрозванный³**¹*Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*²*Лаборатория молекулярного и клеточного сигналинга, Левен, Бельгия*³*Отделение физиологии, Юго-западный медицинский центр, Даллас, США***E-mail: margarita075@gmail.com*

Белки семейства Vcl-2 представляют собой важные модуляторы динамики внутриклеточного Ca²⁺. Антиапоптотический белок Vcl-2 блокирует высвобождение Ca²⁺ из эндоплазматического ретикула (ЭР) путем прямого связывания и ингибирования инозитол-1,4,5-трифосфатных рецепторов (IP3Rs), внутриклеточного канала высвобождения Ca²⁺. Связывание Vcl-2 с IP3R подавляет проапоптотическую передачу сигналов Ca²⁺, указывая на то, что комплекс Vcl-2-IP3R является потенциальной терапевтической мишенью для заболеваний, связанных с устойчивостью к гибели клеток из-за Vcl-2, таких как некоторые виды рака. Домен VN4 белка Vcl-2 необходим и достаточен для связывания и ингибирования IP3R. Мутация K17 D (с образованием белка Vcl-2K17D) ослабляет способность Vcl-2 сильно связывать и ингибировать каналы IP3R. В текущих экспериментах мы намеревались оценить совместную локализацию Vcl-2 и IP3R в группах нейронов гиппокампа мышей дикого типа и линии 5xFAD (линия, моделирующая болезнь Альцгеймера). Проведенные эксперименты показали, что оба белка находятся в соме нейронов, преимущественно в виде кластеров, которые характеризуются низким уровнем совместной локализации как в нейронах гиппокампа

дикого типа, так и в линии 5xFAD. Применение метода экспансионной микроскопии позволило показать, что некоторые кластеры Bcl-2 находятся в контакте с кластерами IP3R1. На основании полученных данных было высказано предположение, что эти белки расположены в разных клеточных органеллах, IP3R1 – в эндоплазматическом ретикулуме, а Bcl-2 – в митохондриях, где он кластеризуется в местах контакта с ЭР, в так называемых митохондриально-ассоциированных мембранах (МАМ). В будущем планируется провести эксперименты для подтверждения данной гипотезы (иммуногистохимическое окрашивание срезов мозга кроликами моноклональными антителами Tom20 для окрашивания митохондрий). Кроме того, исследование показало, что белок mCherry-Bcl-2-K17D, у которого нарушено связывание IP3R, так же, как и mCherry-Bcl-2, образует кластеры в some нейронах гиппокампа.

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА ШАПЕРОН-ЗАВИСИМОЙ АУТОФАГИИ LAMP2 В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА И НЕОКОРТЕКСА КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИЕЙ

А. В. Чурилова^{1,*}, Т. Г. Зачепило¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: annch05@mail.ru

Шаперон-зависимая аутофагия – тип аутофагии, при которой белки с нарушенной структурой распознаются специфическими рецепторами и транспортируются непосредственно в лизосому для деградации. Активность шаперон-зависимой аутофагии лимитируется наличием рецептора LAMP2, который локализуется в мембране лизосом и осуществляет транспорт поврежденных белков через нее. Механизмы шаперон-зависимой аутофагии осуществляют “контроль качества” внутриклеточных компонентов и направлены на поддержание клеточного гомеостаза, что необходимо для дифференциации, развития и нормального функционирования клеток. Прогрессирование некоторых форм нейродегенеративных заболеваний (болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона) связано с накоплением белковых агрегатов и невозможностью их деградации в лизосомах, что во многом определяется нарушением механизмов шаперон-зависимой аутофагии. Модуляция шаперон-зависимой аутофагии, в частности, за счет изменения экспрессии рецептора LAMP2, считается одним из перспективных подходов в лечении и профилактики ряда нейродегенеративных заболеваний. Понимание специфики экспрессии LAMP2 в разных структурах мозга, а также изучения способов модуляции LAMP2 представляет актуальную задачу для биологии. Целью исследования была оценка содержания уровня LAMP2 и экспрессии гена *lamp2* в гиппокампе и неокортексе крыс в норме и после воздействия гипобарической гипоксией (ГГ, 180 мм рт ст., 3 ч). Было обнаружено, что у контрольных животных уровень LAMP2 выше в неокортексе, чем в гиппокампе. После введения животным хлорохина, который приводит к блокированию лизосомальной деградации, уровень LAMP2 увеличивался в гиппокампе, но не неокортексе крыс. Это свидетельствует о более высокой скорости оборота LAMP2 в гиппокампе по сравнению с неокортексом крыс. Воздействие ГГ приводило к снижению содержания LAMP2 через 1 сут в гиппокампе крыс. Вместе с тем, к 3 сут после ГГ было отмечено увеличение экспрессии *lamp2*, а уровень белка возвращался к контрольному значению. В неокортексе крыс экспрессия *lamp2* увеличивалась к 3 ч после воздействия ГГ, а содержание LAMP2 не изменялось. Полученные данные свидетельствуют о том, что характер экспрессии LAMP2 различается в гиппокампе и неокортексе крыс, как в норме, так и после воздействия ГГ. В гиппокампе наблюдается вызванное воздействием ГГ истощение запасов белка LAMP2, которое, очевидно, компенсируется за счет отсроченного увеличения экспрессии гена *lamp2*. В неокортексе происходит усиление экспрессии гена *lamp2* на раннем сроке после ГГ, в результате чего не происходит снижения содержания белка LAMP2. Учитывая установленную роль шаперон-зависимой аутофагии в проадаптивных механизмах, очевидно, усиление экспрессии *lamp2* и восстановление за счет этого уровня LAMP2 отражает компенсаторный механизм, направленный на восстановление нормального функционирования нейронов после воздействия ГГ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-04-01152).

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ NAPQI

В. О. Широкова^{1,*}, Д. А. Гуртьев¹, М. Н. Мокшина¹, А. В. Малашихина¹, А. Р. Ислямов¹,
М. А. Цыздоев¹, Т. А. Дудниченко¹, Ю. А. Власова¹

¹ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: valeriya.shirokova05@mail.com

Актуальность: в настоящее время широко обсуждается вопрос о возможном негативном влиянии парацетамола на развивающийся плод, приводящем впоследствии к возникновению расстройств аутического

спектра у детей. В современной литературе имеются указания на нейротоксические эффекты парацетамола в экспериментах *in vitro*. Но кроме парацетамола токсическое действие могут оказывать и его метаболиты, например, NAPQI (N-ацетил-р-бензохионимин).

Целью данного исследования является изучения влияния парацетамола и NAPQI на астроглию мозга новорожденных крысят.

Методы: астроглию выделяли из мозга однодневных новорожденных крысят как описано ранее (Foo, 2011). За сутки до эксперимента клетки подвергались действию 1 мкг/мл парацетамола или 0.15 мкг/мл NAPQI. После этого добавлялась 0.2 мМ перекись водорода на 1 ч. После этого проводили изучение цитотоксичности МТТ-методом (Власова, 2019).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методом попарных сравнений по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение: оптическая плотность в полученных пробах пропорциональна количеству выживших клеток. В контроле она составила 0.57 ± 0.02 , в клетках, подвергнутых только действию перекиси водорода – 0.53 ± 0.01 , только действию парацетамола – 0.53 ± 0.02 . Преинкубация с NAPQI вызывала снижение жизнеспособности, оптическая плотность снизилась до 0.45 ± 0.05 , совместная инкубация с NAPQI и перекисью водорода вызвала снижение до 0.43 ± 0.04 (различия достоверны по сравнению с перекисью водорода, $p < 0.05$). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о токсическом действии NAPQI на клетки астроглии новорожденных крысят.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Власова Ю.А., Загородникова К.А., Иванова И.С., Чухно А.С. 2019. Влияние окислительного стресса на нейротоксический эффект ацетаминофена. Бултеровские сообщения. Т. 59. № 9. С. 106.

Foo L.C., Allen N.J., Bushong E.A., Ventura P.B., Chung W.S., Zhou L., Cahoy J.D., Daneman R., Zong H., Ellisman M.H., Barres B.A. 2011. Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron*. V. 71. P. 799.

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК МОЗГА ПРИ СТАРЕНИИ САМЦОВ И САМОК МЫШЕЙ ЛИНИИ СЗН

О. М. Широкова¹, П. В. Пчелин^{1,2}, О. Г. Заборская^{1,2}, С. А. Коротченко¹, В. И. Першин^{1,2},
Н. С. Максимова¹, М. С. Гусева^{1,2}, И. В. Мухина^{1,2}

¹Приволжский исследовательский медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Россия

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*E-mail: shirokovaom@gmail.com

Исследование различий в особенностях старения мужского и женского организма представляет значительный интерес для разработки подходов коррекции возрастных нарушений. При изучении таких нарушений мозга особое внимание уделяется мышам линии СЗН в связи с их высокой резистентностью к факторам стресса, в частности, наблюдаемых при ишемии.

Целью исследования являлось изучение поведенческих, функциональных и морфологических изменений, наблюдаемых у самцов и самок мышей линии СЗН при нормальном старении.

Мыши линии СЗН были сгруппированы по возрасту (молодые – 4–8 мес., старые – 20–24 мес., $n = 4$) и полу (самцы и самки). По поведенческим тестам оценивались двигательная, исследовательская активность, долговременная и кратковременная память. Функциональные изменения оценивались по митохондриальному дыханию посредством респирометрии высокого разрешения (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Австрия). Для определения морфологии и распределения микроглиальных клеток и общей морфологии астроцитов использовался метод иммуногистохимии. Для определения ультраструктурных особенностей, в частности, митохондрия-эндоплазматических контактов, использовался метод классической просвечивающей электронной микроскопии. Молекулярные методы, такие как вестерн-блоттинг и ПЦР в реальном времени позволили выявить роль нейровоспаления при нормальном старении у самцов и самок.

По результатам анализа поведения показано, что среди самцов физиологическое старение снижает локомоторную активность и количество базовых поведенческих актов, однако среди самок достоверных различий по данным показателям не выявлено. Биологическое старение значительно снижает обучаемость как самцов, так и самок, при этом ухудшение пространственной памяти наиболее выражено у самок. При анализе митохондриального дыхания отмечена общая тенденция к снижению АТФ-зависимого дыхания у ста-

рых мышей. У самок старых мышей отмечено достоверное снижение дыхания при окислительном фосфорилировании, емкости электрон-транспортной цепи, индекса дыхательного контроля (ДК). Интересно отметить, что ДК, отражающий степень сопряжения между процессами окисления и фосфорилирования, изначально достоверно выше у самок, чем у самцов в молодом возрасте. В отличие от самок, у самцов отмеченные изменения не наблюдались, компенсация интенсивности происходила за счет базального дыхания без синтеза АТФ. Данные результаты подтверждаются морфологическими исследованиями, такими как ультраструктурный анализ митохондриального аппарата и иммуногистохимическое маркирование на клеточный состав.

Выводы: было продемонстрировано, что степень проявленности и механизм формирования возраст-зависимых изменений на клеточном и организменном уровнях значительно различаются в зависимости от пола.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 22-15-20043).

СЕКЦИЯ “СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА”

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ КЛЕТОЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ В ХОДЕ ПЕРЕДНЕЙ И ЗАДНЕЙ РЕГЕНЕРАЦИИ *PYGOSPIO ELEGANS* (SPIONIDAE)

К. З. Астер^{1, 2, *}, В. В. Старунов^{1, 2}, З. И. Старунова², К. В. Шунькина², Е. Л. Новикова^{1, 2}

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

²Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: clem.aster1218@gmail.com

Передняя и задняя регенерация аннелид осуществляется по механизму эпиморфоза — под раневым эпителием закладывается регенерационная бластема из недифференцированных мезодермальных клеток. Бластема может формироваться в результате дедифференцировки клеток, и такой вариант отмечен для многих исследованных видов аннелид. В то же время у некоторых видов были найдены мультипотентные стволовые клетки, участвующие в образовании бластемы, однако часто они — не единственный источник. На данный момент стволовые клетки были обнаружены только у представителей группы *Sedentaria*, преимущественно у группы *Clitellata*, входящей в ее состав.

Стволовые клетки обычно сохраняют пролиферативную активность, хотя иногда они могут находиться в “спящем” состоянии. У дифференцированных клеток в свою очередь обычно снижается уровень пролиферативной активности. Для изучения клеточной пролиферации часто используется метод включения 5-этил-2'-дезоксинуридина (EdU) в ДНК клеток во время репликации.

Мы исследовали динамику пролиферации клеток в ходе передней и задней регенерации *Pygospio elegans* (Spionidae). Это седентарная аннелида, не относящаяся к группе *Clitellata*. Кроме того, этот червь обладает анцестральными для *Sedentaria* признаками, поэтому он является интересным объектом для дальнейшего сравнительного анализа. В результате инкубации интактных животных с EdU происходило включение меток в их клетки, а затем после разрезания животных вслед за инкубацией меченые клетки или их потомки через некоторое время оказывались в области регенерата. Однако нельзя сделать однозначный вывод о формировании регенерата за счет стволовых клеток, так как иногда дифференцированные клетки могут возобновлять пролиферативную активность. Кроме того, неизвестно, были ли источником клеток регенерата клетки из прилежащего к нему сегмента или клетки мигрировали из более удаленных участков тела животного.

Для того чтобы установить природу этих клеток, мы запланировали проанализировать характер экспрессии генов-маркеров мультипотентности клеток. Наличие экспрессии этих генов в клетках интактных животных будет свидетельством в пользу участия стволовых клеток в регенерации, а их *de novo* экспрессия в области регенерата — в пользу клеточной дедифференцировки. На данном этапе исследования нам удалось клонировать гены *piwi1* и *vasa* и получить первичные данные об их экспрессии на интактных червях методом гибридизации *in situ*. Более детальное исследование экспрессии в ходе регенерации планируется в дальнейшем. Также в транскриптом был найден ген *piwi2*, однако он еще не был клонирован.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 21-14-00304) и проводилась на базе Центра коллективного пользования “Таксон”.

АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ХОДЕ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ *PYGOSPIO ELEGANS* (ANNELIDA)

Г. А. Бармасова^{1,2,*}, В. В. Старунов^{1,2}, З. И. Старунова², Е. Л. Новикова^{1,2}

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

²Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: st054827@student.spbu.ru

Апоптоз является неотъемлемым элементом любых процессов развития, в том числе и регенерации. Он обеспечивает формирование правильных контуров новообразованных структур, подавляет иммунные и воспалительные реакции, способствует уничтожению поврежденных или ненужных структур и органов. Помимо прочего, была показана роль апоптоза в качестве пролиферативного фактора, запускающего активные клеточные деления. По всей видимости, подобные процессы имеют место и в ходе репаративной регенерации аннелид, однако детали их остаются мало изученными.

Аннелиды являются одними из наиболее востребованных объектов для изучения процессов регенерации по ряду причин. Во-первых, они проявляют высокий уровень регенеративных способностей: некоторые виды способны восстановить полноценное тело из единственного сегмента. Во-вторых, уровень репаративных способностей аннелид варьирует очень заметно среди представителей таксона, благодаря чему становится возможным проведение сравнительного анализа с целью выяснения регенерационных механизмов, а также причин такой вариативности. Наконец, немаловажным фактом являются относительно небольшие размеры многих представителей и их неприхотливость в содержании, что значительно облегчает проведение экспериментов.

Выбранный нами для исследования объект *Pygospio elegans* Claparède 1863 – небольшая седентарная полихета из семейства Spionidae, обитающая в северных морях. Замечательной является ее способность осуществлять как постериорную, так и антериорную регенерацию. Целью нашей работы является изучение роли апоптотических процессов в ходе регенерации *P. elegans*. В рамках этой цели были поставлены следующие задачи: выявление клеток, уходящих в апоптоз в ходе регенерации; изучение пространственно-временной динамики экспрессии генов, связанных с процессами апоптоза, в ходе регенерации; сравнение процессов апоптоза в ходе задней и передней регенерации.

Для детекции апоптирующих клеток нами был выбран метод TUNEL, обеспечивающий связывание флуоресцентной метки с двуцепочечными разрывами ДНК, возникающими в ходе ее дегградации во время апоптоза. Данная методика была разработана для использования на клеточных культурах и гистологических срезах. В случаях работы с целыми животными это вызывает определенные трудности, связанные с ухудшенным проникновением ферментов через покровы. В связи с этим протокол метода TUNEL был видоизменен и усовершенствован таким образом, чтобы обеспечить успешное его использование на целых животных. Также нами был использован метод РНК-гибридизации *in situ* для изучения пространственно-временного паттерна экспрессии генов, кодирующих регуляторы апоптоза, такие как *Bcl* и *Bax*.

Нами было обнаружено, что число клеток, уходящих в апоптоз в бластеме, значительно превышает число апоптирующих клеток в интактных областях. Также было показано, что процессы апоптоза идут наиболее активно на стадии 18 ч после ампутации, что согласуется с гипотезой о роли апоптоза как фактора пролиферации, иницирующего органогенез.

РОЛЬ ФАКТОРОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ В РАННЕЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Е. И. Бахмет^{1,*}, М. Н. Гордеев¹, А. С. Зиновьева^{1,2}, Е. Е. Петренко^{1,2}, А. Н. Томилин¹

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

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

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

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) отличаются способностью к самообновлению и к дифференцировке во все типы соматических, а также в половые клетки. Транскрипционные факторы Oct4, Sox2 и Nanog являются ключевыми маркерами ЭСК, и необходимы для индукции и поддержания плюрипотентности. Несмотря на то, что эти факторы принято рассматривать исключительно в данном контексте, в последнее время появляются свидетельства об их участии в дифференцировке ЭСК.

Наши исследования направлены на изучение роли Oct4, Sox2 и Nanog в ходе спецификации ЭСК в направлении экто-, мезо- и энтодермы. Кроме того, наша работа направлена на выявление ключевых аминокислот, которые определяют функции этих факторов как регуляторов плюрипотентного состояния и как индукторов дифференцировки. Для решения этих задач мы используем современные методы молекулярной и

клеточной биологии. В их числе индуцибельная деградация белка, репортерные линии ЭСК, репрограммирование дифференцированных клеток с помощью коктейля Яманаки, а также протоколы дифференцировки ЭСК, максимально приближенные к таковым процессам, происходящим в эмбриогенезе.

В настоящий момент нам удалось выяснить, что экспрессия *Nanog* необходима для корректной спецификации ЭСК в направлении дефинитивной энтодермы. Уровень этого фактора падает при переходе в “праймированное” состояние, характерное для плюрипотентных клеток перед гастрულიей. При этом, с началом энтодермальной дифференцировки, экспрессия *Nanog* ре-активируется, что согласуется с данными, полученными при изучении эмбрионального развития мыши. Мы показали, что элиминация этого фактора не влияет непосредственно на запуск этой спецификации, т.к. наблюдается активация типичных маркеров *Sox17* и *Foxa2*. Однако количество энтодермальных клеток в отсутствие *Nanog* оказалось в 5 раз меньше, чем в контроле. Нами также получены новые данные о ключевых аминокислотах *Oct4*, участвующих в опосредовании контакта с его партнером — *Sox2*. Замены этих аминокислот на те, что представлены у его парало-гов, привели к тому, что этот фактор стал функционировать как индуктор нейроэнтодермальной спецификации. В настоящий момент мы работаем над созданием новых репортерных линий ЭСК, оптимизацией метода индуцибельной деградации белка, а также выявлением роли *Oct4* и *Sox2* в мезодермальной и эктодермальной дифференцировке соответственно.

КАРДИОСФЕРЫ, ОБОГАЩЕННЫЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ, КАК МОДЕЛЬ ПЕРИВАСКУЛЯРНОЙ НИШИ В СЕРДЦЕ

Ю. Д. Василец^{1, 2, *}, К. В. Дергилев¹, А. А. Гусева^{1, 2}, М. А. Болдырева¹, Е. В. Парфенова^{1, 2}, И. Б. Белоглазова¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: eleagnusom@gmail.com

Введение. В поддержании тканевого гомеостаза в сердце и в его репарации огромную роль играет сосудистая сеть. Локально регуляция осуществляется путем межклеточных и секреторных взаимодействий в периваскулярной нише, т.е. в “микрочреждении сосуда”, состоящего из клеток (эндотелиальных и муральных, фибробластов) и матрикса (коллаген, ламинин). Изучение механизмов функционирования периваскулярной ниши требует разработки 3D *ex vivo* клеточных моделей, обогащенных эндотелием.

Цель. Разработать метод получения и выполнить характеристику 3D-клеточной модели периваскулярной ниши сердца.

Материалы и методы. В работе использованы образцы сердец мышей линии C57Bl/129. Для моделирования периваскулярной ниши использовали сфероиды (кардиосферы) на основе комбинации кардиальных клеток (КК) и эндотелиальных клеток (ЭК). КК получали методом эксплантной культуры в среде IMDM, содержащей 20% сыворотки. ЭК получали путем ферментативной диссоциации сердечной ткани (1 мг/мл коллагеназа А, 30 мин при 37°C) с последующей иммуномагнитной селекцией по маркеру CD31, и культивировали в среде EGM2-MV на желатине. ЭК метили 5 мкМ флуоресцентным красителем CellTracker™ Green CMFDA. Для обогащения кардиосфер эндотелиальными клетками ЭК и КК комбинировали (3 : 50, 1 : 5 и 2 : 5) и культивировали в планшетах с низкоадгезивным U-образным дном (Nunc) в среде для кардиосфер (35% IMDM, 65% DMEM/F-12, 3% сыворотки) в течение 3 дней. Обогащенные ЭК кардиосферы характеризовали путем иммунофлуоресцентного окрашивания и оценивали проангиогенные свойства по способности формировать “сосудистую сеть” в фибриновом геле и секретировать факторы-регуляторы ангиогенеза (ProteomeProfiler antibody array).

Результаты. ЭК в комбинации с КК способны формировать сфероиды в планшетах с U-образным дном, в отличие от тотальной популяции ЭК, при этом размер и форма сфероидов не зависели от доли ЭК. Обогащенные ЭК кардиосферы окрашивались на маркеры эндотелиальных (CD31) и гладкомышечных (SMA) клеток, а также на компоненты внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин, ламинин), и были способны секретировать факторы-регуляторы ангиогенеза (MCP-1, MIP-1 α , MMP3 и др.). Эффективность образования сосудистых структур (число и длина отростков) была выше в обогащенных ЭК кардиосферах в сравнении с монокультурой ЭК, сформированной в виде агрегатов неправильной формы. Все это указывает на сохранение в обогащенных ЭК кардиосферах принципов взаимной регуляции, характерных для периваскулярных ниш *in vivo*.

Выводы. Таким образом, нами разработана 3D *ex vivo* модель периваскулярного микрочреждения в сердце — обогащенные ЭК кардиосферы. В их состав входят эндотелиальные и муральные клетки, компоненты матрикса, а также сохраняется специализированная секреторная и проангиогенная активность, что позволяет использовать данную модель для изучения механизмов регуляции периваскулярной ниши сердца.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-15-00327).

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ В ПРОФИБРОТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ ДЕМОНСТРИРУЮТ ПРИЗНАКИ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ И ОБРАТИМО УТРАЧИВАЮТ АНТИФИБРОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

М. А. Виговский^{1, 2, *}, Н. А. Басалова¹, У. Д. Дьячкова², М. С. Арбатский², О. А. Григорьева¹, А. Ю. Ефименко¹

¹Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Кафедра биохимии и молекулярной медицины факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: vigovskiy_m.a@mail.ru

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) выступают важнейшими регуляторами процессов репарации и регенерации постнатальных тканей после повреждения. Во многих исследованиях была показана способность секретом МСК, в том числе фракции внеклеточных везикул (ВВ), предотвращать развитие фиброза в ответ на повреждение. В нашей лаборатории ранее была продемонстрирована способность ВВ-МСК подавлять в *in vitro* модели дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Но, как и любой другой биологический объект, МСК воспринимают сигналы микроокружения и отвечают на них в том числе изменением своего секрета. Повреждение ткани сопровождается воспалением, продукцией активных форм кислорода и перестройкой внеклеточного матрикса (ВКМ), что в совокупности существенно изменяет микроокружение МСК. Целью данной работы было определить наличие, характер и стабильность изменений регуляторных антифибротических свойств ВВ-МСК под действием факторов, характерных для развития фиброза как неблагоприятного исхода заживления, в *in vitro* модели изменения микроокружения МСК.

Нам удалось показать, что МСК в профибротических условиях, моделируемых с помощью культивирования клеток на децеллюляризованном ВКМ фибробластов и добавления основного профибротического фактора TGF β , приобретают признаки клеточного старения (сенесценции). Основными признаками сенесценции принято считать арест клеточного цикла, метаболические перестройки, специфические изменения состава секрета и способность избежать гибели путем апоптоза. В этой же модели ранее мы идентифицировали методом анализа транскриптома единичных клеток характерный для клеточного старения профиль транскрипции. В данной работе клеточное старение оценивали по повышению экспрессии в МСК ингибитора клеточного цикла p21. Полученные ВВ от МСК после индукции старения утрачивали способность подавлять дифференцировку фибробластов в миофибробласты *in vitro*, что свидетельствует о нарушении антифибротических регуляторных свойств сенесцентных МСК при моделировании фиброза. Однако, через 2 недели последующего культивирования в полной среде без добавления TGF β доля p21+ клеток в культуре снижалась, а способность ВВ подавлять дифференцировку миофибробластов восстанавливалась до уровня эффекта ВВ-МСК, полученных от контрольных клеток. Примечательно, что в модели, где клеточное старение МСК индуцировали действием перекиси водорода, восстановления функции через две недели не наблюдали.

На основании полученных результатов была выдвинута гипотеза об этапности развития индуцированной сенесценции МСК в условиях фиброза и возможности реверсии изменений на начальных этапах. Из полученных результатов следует, что ВКМ и однократное воздействие TGF β носят более мягкий характер и индуцируют начальное клеточное старение, тогда как индукция перекисью приводит к завершённому или глубокому старению МСК, реверсия которого затруднена.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-29-04172).

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО ФОНА НА ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КЛЕТОК СТРОМЫ ЭНДОМЕТРИЯ МЫШИ

А. О. Гайдамака^{1, *}, Л. Ш. Измайлова¹, Е. А. Воротеляк¹

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

*E-mail: stadtrand@yandex.ru

Эндометрий является внутренней оболочкой матки. В ходе менструального цикла у человека и эстрального цикла у мыши он проходит фазы пролиферации, дегенерации и регенерации. Эндометрий поддерживает имплантацию семиаллогенного эмбриона. Также стромальный компартмент способен проходить децидуальную реакцию для обеспечения имплантации эмбриона, в ходе которой клетки стромы дифференцируются, приобретая эпителиоидную морфологию. Все эти процессы обусловлены взаимодействием различных популяций стромальных клеток друг с другом и с клетками других типов (эпителий, эндотелий, иммунные клетки). Субпопуляции стромальных клеток лишь отчасти описаны для эндометрия человека и почти не описаны у мыши.

В этой работе мы выявили гетерогенность клеток стромы эндометрия мыши на основании экспрессии таких маркеров, как CD90 и CD146 (предполагаемые маркеры прогениторной популяции эндометрия), а также YAP, участника сигнального пути Hippo. Субпопуляции стромальных клеток были локализованы на гистологических препаратах матки мыши в ходе эстрального цикла, а также в момент имплантации эмбриона, то есть в условиях различного гормонального фона. В дополнение к этому, была исследована локализация транскрипционного фактора YAP в эндометрии мыши.

Анализ уровней экспрессии генов предполагаемых маркеров стволовой популяции эндометрия (*Thy1*, *Susd2*, *Pdgfrβ* и *Mcam*) проводили при помощи метода ПЦР-РВ для первичной культуры клеток стромы эндометрия после обработки прогестероном и эстрадиолом и без обработки. Также была исследована экспрессия генов, кодирующих компоненты сигнального пути YAP (*Yap*) и TAZ (*Wwtr1*) и их предполагаемые эффекторы: *Ccn1* и *Ccn2*. Уровни экспрессии исследуемых генов статистически значимо не различались между пробами, однако мы показали, что наблюдается статистически значимая корреляция между уровнями экспрессии генов *Yap*, *Wwtr1* и *Ccn1*. Кроме того, мы наблюдали тенденцию к повышению уровня экспрессии *Susd2* при обработке клеток половыми гормонами.

Для изучения самоорганизации клеток эндометрия в 3D-культуре были получены органоиды из клеток эпителия и стромы эндометрия. Для создания органоидов на основании анализа литературы был подобран состав среды, включающий в себя питательные добавки и ростовые факторы, способствующие самоорганизации клеток в составе органоидов. В некоторых органоидах была обнаружена гетерогенность клеток стромы по интенсивности флуоресценции антител против маркера CD90. Наиболее интенсивная флуоресценция наблюдалась в области стромы, подлежащей слою эпителия.

Сейчас высказывается множество предположений на тему того, что функционирование ткани зависит от молекулярного диалога между морфологически сходными клетками. Наша работа вносит вклад в изучение гетерогенности внутри популяции стромальных клеток в ходе основных функциональных изменений эндометрия мыши.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-30015).

ПОДАВЛЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МИОФИБРОБЛАСТОВ С ПОМОЩЬЮ ИНДУКТОРОВ АДИПОГЕНЕЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ И РЕВЕРСИИ ФИБРОЗА

О. А. Григорьева^{1, *}, Н. А. Басалова¹, М. А. Виговский^{1, 2}, У. Д. Дьячкова², А. Ю. Ефименко^{1, 2}

¹Институт регенеративной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: go.grigorievaolga@gmail.com

Наиболее распространенным исходом репаративной регенерации у млекопитающих является развитие фиброза. Развитие фиброза представляет собой комплексный процесс, при котором результатом межклеточной коммуникации является формирование пула миофибробластов, основных эффекторных клеток фиброза. Дифференцировка различных клеток, в том числе мультипотентных, в миофибробласты сопровождается активацией транскрипции генов альфа гладкомышечного актина (α SMA), фибронектина и других. Актуальной задачей современных исследований является изучение механизмов дифференцировки стромальных клеток и управления этими процессами. Так, в недавнее время были получены данные, что переключение дифференцировки стромальных клеток в направлении адипогенной дифференцировки может снизить количество миофибробластов в ткани легких и тем самым остановить развитие фиброза. Механизмы этого процесса до конца не ясны и требуют детального изучения.

Мы проанализировали массивы информации о генах, полученные нами с помощью РНК-секвенирования транскриптома единичных клеток, дифференциально экспрессирующихся в образцах мультипотентных стромальных клеток (МСК) жировой ткани человека, в которых была индуцирована дифференцировка в миофибробласты и адипоциты. Были обнаружены гены, разнонаправленно экспрессирующиеся в моделях двух дифференцировок. Для дальнейшего изучения роли продуктов данных генов в изменении программы дифференцировок клеток нами была разработана клеточная модель реверсии фиброза с использованием легочных фибробластов человека. Стимуляция трансформирующим фактором роста (TGFβ) приводила к росту продукции α SMA и увеличению уровня формирования стресс-фибрилл, росту экспрессии гена EDA-фибронектина (EDA FN), кроме того, увеличивалась способность клеток contracting коллагеновый диск, что говорит о появлении в клеточной популяции дифференцированных миофибробластов. При последовательном добавлении TGFβ и индукторов адипогенной дифференцировки количество α SMA, стресс-

фибрилл, а также сократительная способность клеток значительно снижались. Также была показана значительная стимуляция экспрессии мастера-гена адипоцитарной дифференцировки – PPAR γ , а также FABP4.

ПЦР-анализ образцов, полученных в разработанной модели, показал, что гены FN1 (фибронектин-1), CHD3 (хеликазный хромодомен ДНК-связывающего белка 3), NTM (нейротримин), VCAN (версикан), RHD10 (ретинолдегидрогеназа-10), выявленные в результате предварительного биоинформатического анализа образцов дифференцировки МСК человека, также разнонаправленно экспрессируются в фибробластах легких человека. Для указанных генов был обнаружен рост экспрессии в модели TGF β -индуцированной дифференцировки в миофибробласты и снижение экспрессии в клетках после воздействия адипогенных индукторов.

Полученные данные позволяют лучше понять механизмы трансдифференцировки миофибробластов и выявить новые перспективные мишени для лекарственной терапии фиброза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-315-70002).

РОЛЬ И РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RUNX2 В ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ОСТЕОБЛАСТОВ

Е. С. Громова^{1,*}, Д. А. Костина¹, Д. С. Смирнова¹, А. Б. Малашичева¹

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

*E-mail: kate.gromova01@mail.ru

Runx2 экспрессируется в клетках, имеющих остеофенотип, и является маркером остеогенной дифференцировки. Runx2 является ключевым регулятором и маркером остеогенной дифференцировки как при нормальной кальцификации и дифференцировке остеобластов, так и при патологической кальцификации, в частности, сосудов и клапанов сердца, но изменение экспрессии Runx2 при активации остеогенной дифференцировки остается малоизученным. Известно, что экспрессия Runx2 необходима для остеогенной дифференцировки. При этом среди негативных регуляторов Runx2 присутствуют некоторые индукторы остеогенной дифференцировки. На мышинных остеобластах было показано, что витамин D3 и стероидные гормоны могут негативно влиять на уровень экспрессии данного транскрипционного фактора и оказывать дозозависимое ее подавление. Классический фактор остеогенной дифференцировки дексаметазон снижал уровень экспрессии Runx2 в крысиных остеобластах, однако в других клеточных моделях такой эффект не наблюдался.

Целью работы являлось выяснение роли Runx2 на поздних этапах остеогенной дифференцировки. С помощью лентивирусной трансдукции мы активировали либо подавляли продукцию Runx2 в первичной культуре остеобластов человека, для которых свойственна экспрессия Runx2. Мы наблюдали увеличение экспрессии генов-мишеней Runx2 при увеличении его экспрессии остеобластами. Однако методом иммуноцитохимии было показано снижение содержания маркеров остеогенной дифференцировки при активации Runx2 методом лентивирусной трансдукции, а активность промотора *RUNX2* не возростала в указанных условиях.

Полученные результаты позволяют предположить наличие в остеобластах человека отрицательной обратной связи в ответ на увеличение уровня транскрипции гена *RUNX2*, а также присутствие регуляции Runx2 на посттрансляционном уровне в этих клетках и сделать вывод о важности поддержания определенного уровня продукции белка Runx2 для сохранения остеофенотипа этих клеток и способности к остеогенной дифференцировке.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-14-00152п).

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ СИСТЕМ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОСЕНСОРА ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НУРЕР

Н. А. Гурьев^{1,2,*}, Ю. С. Иванова¹, Н. А. Пуговкина¹, О. Г. Люблинская¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: nekitos.99.99@gmail.com

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) являются перспективным клеточным материалом для использования в регенеративной медицине. Известно, что окислительный стресс в плюрипотентных клетках обладает широким спектром действия и, в зависимости от степени, может приводить как к

индукции апоптоза, так и к запуску различных программ дифференцировки (Kaitsuка, Hakim, 2021). Системы антиоксидантной защиты играют критическую роль в формировании клеточного ответа на окислительный стресс, однако особенности функционирования этих систем в иПСК до сих пор остаются не до конца изученными. Во многом это связано с высокой скоростью протекания редокс-реакций и ограниченным набором аналитических методов, что затрудняет прижизненный количественный анализ внутриклеточных редокс-процессов.

Создание флуоресцентного генетически-кодируемого биосенсора HuPer, специфично и высокочувствительно взаимодействующего с молекулами H_2O_2 (Belousov et al., 2006), дало новый толчок развитию в данной области. Недавно разработанная в нашей лаборатории проточно-цитометрическая методика дает нам возможность использовать биосенсор HuPer в качестве репортерного белка, измерение динамики окисления/восстановления которого позволяет количественно оценить различные редокс-параметры в живой клетке. В нашей работе мы использовали ранее полученную линию иПСК человека, экспрессирующих HuPer в клеточной цитоплазме. Обработка иПСК перекисью водорода в различных концентрациях и последующий анализ динамики окисления сенсора HuPer в клетках позволили нам с высокой точностью определить устанавливающуюся в условиях внешнего окислительного стресса внутриклеточную концентрацию H_2O_2 и, тем самым, дать оценку эффективности работы систем антиоксидантной защиты клетки. Полученные результаты демонстрируют, что разница между внутриклеточной и экстраклеточной концентрациями H_2O_2 зависит от уровня окислительной нагрузки и исчисляется в тысячах раз. Используя ингибиторный анализ, мы также оценили вклад основных антиоксидантных систем в ответ иПСК на окислительный стресс. Данные показали, что при небольшой окислительной нагрузке (<10 мкМ H_2O_2) основную работу по детоксификации перекиси водорода выполняет тиоредоксин-зависимая система, в то время как преимущественный вклад глутатион-зависимой системы наблюдается при увеличении окислительной нагрузки (>10 мкМ H_2O_2). Таким образом, данная работа впервые позволила дать количественную оценку эффективности защиты иПСК от действия окислительного стресса, а также оценить степень вовлеченности различных антиоксидантных систем в этот процесс.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-74-20178).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A. et al. 2006. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. Nat. Methods. V. 3. P. 281.

Kaitsuка T., Hakim F. 2021. Response of pluripotent stem cells to environmental stress and its application for directed differentiation. Biology (Basel). V. 10. P. 1.

МОДИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНОВЫХ ГЕЛЕЙ ФИТИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Е. И. Гурьянов^{1,2,*}, П. О. Никонов¹, А. В. Нащекин³, Ю. А. Нащекина¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Ленинградский государственный университет им. А. С. Пушкина, Санкт-Петербург, Россия

³Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: murlok2000@mail.ru

Коллаген – один из основных белков внеклеточного матрикса. Гели на основе коллагена в сочетании с клетками используются в регенеративной медицине. Такие клеточные продукты могут использоваться в клинической практике при заживлении различных ран, в том числе, и для восстановления кожной ткани. Недостатком коллагенового геля являются его высокая скорость деградации, а, следовательно, и достаточно быстрая потеря механических свойств, что приводит к нарушению жизнедеятельности культивируемых внутри него клеток. Одним из возможных способов улучшения механических свойств коллагенового геля является сшивание его молекул химическими сшивающими агентами. Одним из таких сшивающих агентов может быть фитиновая кислота, добавление которой в состав коллагенового геля будет оказывать заметное влияние на свойства образующихся фибрилл и гидрогелей. Таким образом, целью данного исследования является разработка способов сшивания коллагена фитиновой кислотой и исследование взаимодействия клеток с модифицированным коллагеновым гелем.

Структурные и морфологические изменения коллагенового геля до и после модификации оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и ИК-спектроскопии. Скорость деградации коллагенового геля также оценивали с помощью СЭМ. Для изучения биосовместимости модифицированных гелей исследовали морфологию мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга с помощью конфокальной микроскопии.

Методом ИК-спектроскопии было подтверждено связывание фибрилл коллагена с фитиновой кислотой. Результаты СЭМ продемонстрировали, что присутствие фитиновой кислоты в коллагеновом геле не изменяет нативную структуру коллагеновых фибрилл. Также было показано, что нативная структура коллагеновых фибрилл, сшитых фитиновой кислотой не разрушается как после 2 сут инкубирования в физиологических условиях фосфатного буфера, так и после 7 сут инкубирования в физиологических условиях. В то время как коллагеновые гели без модификации сохраняли нативность структуры после 2 сут инкубирования и практически полностью разрушались после 7 сут инкубирования в физиологических условиях.

Для оценки биосовместимости на модифицированных гелях культивировали МСК в течение 7 дней. Результаты конфокальной микроскопии продемонстрировали, что морфология клеток на модифицированных гелях не отличается от морфологии клеток, культивируемых на гелях без модификации. В обоих случаях клетки имеют вытянутую, характерную для МСК веретеновидную структуру. Также следует отметить, что после одной недели культивирования форма и диаметр модифицированных гелей не меняются, в то время как диаметр немодифицированных гелей уменьшается в 2 раза. Таким образом, модифицированные коллагеновые гели могут быть использованы для культивирования МСК с целью их дальнейшей трансплантации на поврежденную ткань.

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

СФЕРОИДЫ НА ОСНОВЕ ЭПИТЕЛИОПОДОБНЫХ КЛЕТОК МЕЗОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА (ЭПИРОИДЫ) – МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ЭПИ-/СУБЭПИКАРДИАЛЬНОГО ФИБРОЗА

А. А. Гусева^{1,3,*}, К. В. Дергилев¹, З. И. Цоколаева¹, И. Б. Белоглазова¹, Е. В. Парфенова^{1,2}

¹ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, Москва, Россия

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

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

*E-mail: alikaguseva22@gmail.com

Введение. Хроническая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса является широко распространенным заболеванием сердца, ассоциированным с прогрессированием кардиального фиброза и имеющим ограниченные возможности для медикаментозной коррекции. Отсутствие эффективных методов лечения этой патологии в определенной степени связано с отсутствием репрезентативных *in vitro* моделей, которые могут быть использованы для поиска лекарственных мишеней и разработки фармацевтических препаратов направленного действия. Особый интерес в этом отношении представляют клетки эпикардиального мезотелия, которые способны формировать пул фибробластов сердца и участвовать в развитии/прогрессировании фиброза.

Цель исследования. Разработать 3D-модель эпикардиального микроокружения (эпироид) и исследовать влияние профиброзного индуктора на ее свойства.

Методы. Эпителиоподобные клетки эпикардиального мезотелия выделяли из образцов, полученных в ходе операции аорто-коронарного шунтирования от пациентов с ишемической болезнью сердца. Для сборки эпироидов использовали метод культивирования в U-образных чашках с низкоадгезионным покрытием. Характеристику сфероидов проводили с помощью ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинга, методов иммуногистохимического/иммунофлуоресцентного окрашивания.

Результаты. Показано, что сформированные эпироиды образуются путем компактизации клеток, сохраняющих маркеры эпикардиального мезотелия и формирующих ZO-1+ содержащие плотные контакты. Кроме того, эти клетки имеют низкий уровень экспрессии маркеров фибробластов и коллагенового матрикса, что соответствует организации зоны эпикарда в неповрежденном сердце. При воздействии рекомбинантного TGFb1 происходит уменьшение размеров сфероидов, в центральной части которых клетки приобретают веретенообразную форму, усиливают экспрессию генов ММП (мезотелиально-мезенхимального перехода), маркеров фибробластов и накапливают белки внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин), что указывает на признаки фиброзной трансформации.

Выводы. Разработанная модель (эпироид) на основе клеток эпикарда с определенной долей допущения способна воспроизводить некоторые характеристики нативного эпикардиального микроокружения и модулировать клеточный ответ на воздействие профиброзного индуктора TGFb1. Эта модель может быть использована для дальнейшего изучения механизмов регуляции эпикардиального микроокружения и его участия в патогенезе развития фиброза сердца.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-29-04164).

ГИПОКСИЯ СПОСОБСТВУЕТ УСИЛЕНИЮ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ПРОАНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОК КАРДИОСФЕРА. А. Гусева^{1,3,*}, К. В. Дергилев¹, Ю. Д. Василец^{1,2}, И. Б. Белоголазова¹, З. И. Цоколаева¹, Е. В. Парфенова^{1,2}¹ФГБУ “НМИЦ кардиологии” Минздрава России, Москва, Россия²МГУ им. М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия³МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

*E-mail: alikaguseva22@gmail.com

Введение. Реакция на гипоксию является одним из ключевых механизмов адаптации к условиям клеточного микроокружения, определяет выживаемость и функциональную активность прогениторных клеток после трансплантации.

Цель. Изучить противовоспалительные и проангиогенные свойства клеток кардиосфер в условиях гипоксии, используя модель трансплантации клеточного пласта на сердце крысы после экспериментального инфаркта миокарда.

Материалы и методы. Для моделирования инфаркта миокарда у крыс линии Wistar осуществляли перевязку передней нисходящей коронарной артерии. Для получения кардиосфер (КС) использовали образцы сердец мышей линии C57Bl/6J. Кардиосферообразующие клетки получали методом эксплантной культуры в среде IMDM, содержащей 20% сыворотки. Клетки КС культивировали в условиях гипоксии (1% O₂) 24 ч и оценивали противовоспалительные свойства методом ПЦР в реальном времени. Клеточные пласты (КП) на основе клеток КС формировали на чашках NUNCtm с термочувствительным покрытием. Пласты культивировали в условиях гипоксии (3% O₂) и оценивали содержание проангиогенных факторов в среде с помощью набора Angiogenesis Array. С помощью иммунофлуоресцентного и гистохимического окрашивания криосрезов сердца оценивали морфометрические показатели ремоделирования, а также способность клеток КП к пролиферации, миграции и дифференцировке.

Результаты. Для клеток КС в условиях гипоксии наблюдалось повышение секреции проангиогенных факторов VEGF, PlGF, FGF-1, FGF-2, эндотелина-1, MMP-9 и противовоспалительного цитокина IL-10, а также уровней экспрессии противовоспалительных факторов ARG1, CD59a, CD86. На модели ИМ у крысы было показано, что эпикардальная трансплантация КП способствует сохранению жизнеспособности, пролиферации и миграции клеток КС. В прилегающей к КП области сердца сформировалось в 4 раза больше сосудов в сравнении с контрольной группой. Кроме того, наблюдалось снижение уровня гипертрофии кардиомиоцитов в области инфаркта и уменьшение дилатации полости левого желудочка (ЛЖ). Однако, площадь рубцовой ткани и толщина стенки ЛЖ достоверно не изменились.

Выводы. Мы показали, что гипоксия активирует проангиогенные и противовоспалительные свойства клеток кардиосфер *in vitro* и способствует уменьшению воспаления и васкуляризации постинфарктного сердца после трансплантации в составе клеточных пластов *in vivo*. Гипоксическое прекондиционирование может быть использовано в качестве перспективного подхода для повышения репаративных свойств прогениторных клеток сердца.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 17-15-01368П и 19-15-00384П (анализ экспрессии противовоспалительных факторов).

СТАРЕЮЩИЕ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ НАРУШАЮТ РЕДОКС-БАЛАНС В ТРОФОБЛАСТ-ПОДОБНЫХ КЛЕТКАХ И ИНВАЗИЮ МОДЕЛЬНЫХ ТРОФОБЛАСТОВП. И. Дерябин^{1,*}, Ю. С. Иванова², А. В. Бородкина¹¹Группа механизмов клеточного старения, Лаборатория внутриклеточной сигнализации, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия²Лаборатория внутриклеточной сигнализации, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: deryabin.pav@gmail.com

Окислительный стресс в клетках трофобласта негативно влияет на инвазию трофобласта в децидуализирующуюся строму эндометриальной ткани, что приводит к нарушениям имплантации эмбриона. Ранее нами было выявлено, что старение стромальных клеток эндометрия (эСК) может нарушать их децидуальную дифференцировку и соответствующую трансформацию ткани, а также снижать эффективность “имплантации” модельных бластоцист. Известно, что стареющие клетки характеризуются повышенным внутриклеточным уровнем активных форм кислорода (АФК). Важным следствием этого является не только окислительное повреждение внутриклеточных макромолекул и органелл, но также секреция АФК во внеклеточное простран-

ство и повреждение микроокружения стареющей клетки. Так, установлено, что АФК являются ключевыми компонентами ассоциированного со старением секреторного фенотипа, которые могут передаваться в соседние клетки и вызывать в них повреждение ДНК. Поскольку децидуальные ЭСК отвечают за прямое взаимодействие с клетками трофобласта во время имплантации эмбриона, в рамках данной работы мы предположили, что АФК, продуцируемые стареющими ЭСК, могут передаваться клеткам трофобласта и нарушать их функционирование, что может привести к неэффективной имплантации.

В первую очередь, мы подтвердили повышенный уровень внутриклеточных АФК в стареющих ЭСК, а также установили на функциональном и транскриптомном уровнях, что это может быть обусловлено дисфункцией митохондрий и снижением эффективности антиоксидантной защиты. Нарушенная децидуальная трансформация стареющих ЭСК также сопровождалась повышенным уровнем внутриклеточных АФК, накоплением митохондриальных АФК и сниженной эффективностью антиоксидантной защиты по сравнению с дифференцирующимися контрольными клетками. Кроме того, согласно нашим наблюдениям, стареющие ЭСК секретировали повышенное количество АФК во внеклеточное пространство. Примечательно, что при контактном взаимодействии со стареющими ЭСК в трофобласт-подобных клетках смешался редокс-баланс и индуцировался ответ на повреждение ДНК. Используя *in vitro* модель имплантации, мы подтвердили нарушение инвазии трофобласт-подобных сфероидов в монослой децидуализирующихся стареющих ЭСК. Наконец, предварительная обработка стареющих клеток антиоксидантом темполом приводила к восстановлению эффективности инвазии.

Таким образом, настоящее исследование свидетельствует в пользу механизма, реализуемого посредством передачи АФК от стареющих ЭСК к клеткам трофобласта, который, по крайней мере частично, может играть роль в нарушении имплантации эмбриона. Такая передача приводит к накоплению АФК и последующему повреждению ДНК в клетках трофобласта, что может опосредовать нарушение инвазии эмбриона. В свете этих результатов, применение антиоксидантов может рассматриваться в качестве стратегии для повышения эффективности имплантации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-10038).

АЛЬТЕРНАТИВНО АКТИВИРОВАННЫЕ M2-МАКРОФАГИ ИНДУЦИРУЮТ КЛЕТОЧНОЕ СТАРЕНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И НЕОБРАТИМО СНИЖАЮТ ИХ АНТИФИБРОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

**У. Д. Дьячкова^{1,*}, М. А. Виговский^{1,2}, Н. А. Басалова^{1,2}, Н. А. Александрович^{1,2},
О. А. Григорьева², А. Ю. Ефименко^{1,2}**

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

²*Институт регенеративной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

**E-mail: dyachkovauliana@gmail.com*

Мультipotентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) играют важную роль в поддержании гомеостаза и регуляции процесса репарации тканей после повреждения, паракринно стимулируя регенерацию и подавляя прогрессирование фиброза путем секреции растворимых факторов и внеклеточных везикул (ВВ), переносящих специфические некодирующие микроРНК. Однако, в организме МСК подвергаются действию различных факторов, например, цитокинов, секретируемых в ходе возраст-ассоциированного хронического воспаления. Это может приводить к приобретению МСК сенесцентного фенотипа и, как результат, изменять состав их секретомы, тем самым влияя на антифибротические свойства МСК. Поэтому целью нашей работы стало изучить влияние хронического воспаления, обусловленного действием альтернативно активированных макрофагов, на приобретение МСК сенесцентного фенотипа и обратимость изменения их антифибротических свойств.

Для этого мы выделяли моноциты из периферической крови человека центрифугированием на градиенте фикола, запускали дифференцировку макрофагов с помощью GM-CSF, а потом поляризацию добавлением IL-4. Кондиционированная альтернативно активированными макрофагами среда (КС-M2) добавлялась к МСК для индукции клеточного старения. С помощью иммуноцитохимического анализа (ИЦХ) мы показали, что действие КС-M2 вызывает увеличение количества МСК, содержащих p21 – белок-ингибитор клеточного цикла, один из основных маркеров клеточного старения. Таким образом, секретом M2-макрофагов способствует приобретению МСК сенесцентного фенотипа сопоставимо с пероксидом водорода – референсным агентом, хорошо описанным индуктором клеточного старения. Однако последующее культивирование МСК в полной ростовой среде в течение 2 недель без добавления КС-M2 снижает количество p21+клеток до

уровня, сопоставимого с контролем, тогда как в модели с пероксидом водорода, количество p21+клеток остается высоким.

Для изучения изменения антифибротических свойств сенесцентных МСК использовалась *in vitro* модель дифференцировки фибробластов в миофибробласты под действием TGF β -1. Выделенную везикулярную фракцию секрета МСК добавляли к фибробластам кожи человека одновременно с TGF β -1. Затем оценивали степень дифференцировки фибробластов с помощью ИЦХ анализа основного маркера миофибробластов – альфа гладкомышечного актина, встроенного в стресс-фибриллы. Мы показали, что у ВВ, полученных от МСК после действия КС-М2, снижается способность ингибировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты, и не восстанавливается через 2 недели, как и в модели с пероксидом водорода.

Таким образом, хроническое воспаление, обусловленное действием альтернативно активированных макрофагов, способно индуцировать клеточное старение МСК, что приводит к изменению состава их секрета и безвозвратно снижает способность МСК ингибировать развитие фиброза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-29-04172).

УСИЛЕНИЕ АНГИОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПРОЛИФЕРАТИВНО НЕАКТИВНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ *IN VITRO* И *IN OVO*

М. И. Ездакова^{1,*}, Д. К. Матвеева¹, Е. Р. Андреева¹

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: ezdakova.mi@gmail.com

В настоящее время мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) рассматриваются как один из ключевых типов клеток, вовлеченных в репаративное ремоделирование тканей. МСК обладают высокой секреторной активностью, а также низкой иммуногенностью, благодаря чему считаются оптимальным ресурсом для клинического применения после процессирования *in vitro*. Системное введение в кровоток является одним из наиболее часто используемых способов доставки МСК к тканям-мишеням. Предполагается, что попадая в кровеносное русло, МСК следуют по градиенту хемоаттрактантов и, достигая области повреждения, мигрируют через эндотелий сосудистой стенки в периэндотелиальное пространство. Очевидно, что взаимодействие с эндотелиальными клетками (ЭК) является одним из важных факторов, определяющих дальнейшую судьбу инъецированных МСК. Показано, что ЭК продуцируют ряд медиаторов, способных оказывать влияние на МСК, что может повлиять на их дальнейшее участие в репаративных процессах *in vivo*. Целью настоящей работы было оценить, как краткосрочное взаимодействие ЭК и непролиферирующих МСК может повлиять на эффективность сосудодообразования *in vitro* и *in ovo* в хориоаллантоисной оболочке (ХАО) эмбриона перепела.

В работе использовали линейные МСК (ASC52telo – ATCC® SCRC-4000™) и ЭК (EA.hy926 – ATCC® CRL-2922™). Для остановки клеточных делений МСК предварительно обрабатывали митомицином С. Сокультивирование проводили в течение 24 ч. Ненаправленную миграцию в монокультурах ЭК оценивали с помощью экспериментальной модели “рана”. Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной ОТ-ПЦР. Содержание паракринных медиаторов в образцах кондиционированной среды (КС) определяли с помощью MILLIPLEX MAP (Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel – Premixed 41 Plex – Immunology Multiplex Assay). Оценку ангиогенной активности, проводили с использованием *in vitro* (Матригель) и *in ovo* (формирование сосудистой сети в ХАО эмбриона японского перепела (*Coturnix coturnix japonica*)) моделей.

Установлено, что КС, полученная после 24 ч взаимодействия МСК с ЭК, значительно стимулировала ненаправленную миграцию ЭК (1.5 раза) и рост тубулярных структур в Матригеле (1.2 раза), а также рост сосудистой сети в ХАО эмбриона перепела *in ovo* (1.4 раза), по сравнению с КС от МСК. Транскрипционный анализ показал, что после сокультивирования происходило возрастание уровня мРНК IL6, IL8 и MCP1 в обоих типах клеток и уровня мРНК FGF2 в МСК в 7.5 раз ($p < 0.05$). При оценке паракринного профиля в КС от сокультуры МСК-ЭК выявлено достоверное повышение содержания ангиогенных медиаторов (FGF-2, MCP-1, PDGF-AB/BB, IL-6, IL-8 и др.) ($p < 0.05$), что могло обусловить обнаруженные эффекты. Можно предположить, что модификация активности МСК при взаимодействии с ЭК *in vivo* может вносить вклад в усиление их ангиогенного потенциала в процессах репаративного ремоделирования тканей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект проекта № 21-75-10117).

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *POU5F1* (*OCT4*) ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ЕГО ГЕНЕТИЧЕСКИМ ОКРУЖЕНИЕМ

В. В. Ермакова^{1, *}, А. А. Кузьмин¹, А. Н. Томилин¹

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

*E-mail: psichorette@gmail.com

Центральная роль гена *Pou5f1* в поддержании и индукции плюрипотентного состояния эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ЭСК и иПСК) хорошо известна. Но в настоящий момент структура регуляторной сети, в которую вовлечен *Pou5f1*, не до конца изучена. В частности, не ясна функциональная значимость расположения гена *Pou5f1* в центральной области кластера генов главного комплекса гистосовместимости (МНС), который характеризуется высокой плотностью генов, экспрессирующихся в плюрипотентных клетках. Однако, экспрессия *Pou5f1* в клетках взрослого организма ассоциирована с аномалиям развития и канцерогенезом (Aoto et al., 2006).

По мере развития молекулярно-биологических методов для гена *Pou5f1* было выявлено множество CRE (чис-регуляторных элементов): с помощью CREST-seq было выявлено 45 CRE, 17 из которых представляли собой промоторы других генов (Diao et al., 2017). Было показано, что 2–3% всех коровых промоторов человека могут проявлять энхансерную активность (Dao et al., 2017), по ряду признаков промотор *Pou5f1* может обладать подобными свойствами.

Для подтверждения данной гипотезы в ЭСК мыши был осуществлен перенос полноразмерного гена *Pou5f1* в новое генетическое окружение. При этом эндогенная последовательность инактивировалась путем рекомбинации в области промотор-первый экзон по сайтам loxP. За счет нацеленного внедрения последовательности *Pou5f1*, включающей его основные регуляторные элементы, мы можем говорить о генетической идентичности полученных линий, а также о близкой к естественной его регуляции.

За исключением некоторых морфологических отличий, полученные ЭСК обладали сходными с ЭСК дикого типа характеристиками, сохраняли способность к самобновлению, и экспрессировали маркеры плюрипотентности: *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Klf4*, и *Rex1*. В сравнении с контролем ЭСК *Pou5f1^{Δ/Δ}Rosa26^{Pou5f1/+}* показали более равномерное распределение *Klf4*, а также более высокий уровень *Nanog*.

Нами получена уникальная модель, результаты изучения которой позволят нам охарактеризовать совершенно новую активность гена *Pou5f1*, кроющуюся непосредственно в его последовательности, а не в продукте – транскрипционном факторе *Oct4*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-34-90083).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Aoto T. et al. 2006. Nuclear and chromatin reorganization in the MHC-*Oct3/4* locus at developmental phases of embryonic stem cell differentiation. *Dev. Biol.* V. 298. P. 354.

Dao L. T. et al. 2017. Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions. *Nat. Genet.* V. 49. P. 1073.

Diao Y. et al. 2017. A tiling-deletion-based genetic screen for cis-regulatory element identification in mammalian cells. *Nat. Methods.* V. 14. P. 629.

ИЗМЕНЕНИЕ СЕКРЕТОМА ОСТЕОКОММИТИРОВАННЫХ МСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ОТМЕНЫ ОСТЕОГЕННЫХ СТИМУЛОВ

И. В. Живодерников^{1, *}, Е. А. Тырина¹, А. Ю. Ратушный¹

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: kordait-2213@yandex.ru

Методы тканевой инженерии являются перспективными для улучшения регенерации тканей и подготовки тканевых конструктов. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), в частности, жирового происхождения имеют преимущества в силу своей доступности, а их индуцированная дифференцировка в остеогенном направлении является распространенной экспериментальной моделью. Между тем, недостаточно изученным остается функциональное состояние МСК после отмены остеогенных стимулов, то есть в процессе де-дифференцировки. Целью данной работы было исследование секретома МСК жировой ткани человека после отмены остеогенных стимулов.

В эксперименте использовали МСК 2–5 пассажей, которые культивировали при 37°C, содержании O₂ – 20%, CO₂ – 5% и относительной влажности 100%. Остеогенные индукторы добавляли в среду α-МЕМ (дексаметазон, β-глицерофосфат и аскорбиновую кислоту в концентрациях 10 нМ, 10 мМ и 200 мкМ соответственно)

при достижении клетками конфлюэнтности 80–90%. Остеогенное коммитирование проводили в течение 7 сут. После удаления остеогенных индукторов путем замены питательной среды, клетки культивировались в течение 10 сут в стандартных условиях. Оценка содержания цитокинов в кондиционированной среде проводилась при помощи мультиплексного анализа с использованием системы Milliplex xMAP и набора “Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel a 48 Plex Premixed Magnetic Bead Panel” согласно протоколу производителя после 7 сут культивирования в присутствии остеогенных индукторов и после 10 сут последующей дедифференцировки.

Детектируемая концентрация была установлена для 26 из 48 исследуемых цитокинов. Вследствие 7-дневного остеогенного коммитирования изменилась концентрация 10 аналитов. Было обнаружено 15-кратное снижение содержания эотаксина, 12-кратное снижение содержания фактора роста VEGF-A, 10-кратное снижение RANTES, а также снижение содержания факторов роста TNF α , TNF β , цитокинов MCP-1, MCP-3 и IL-13 в 2, 4, 1.5, 2 и 3 раза соответственно. Содержание хемокина GRO α и фактора роста M-CSF повысилось в 5 и 1.5 раза. После 10 сут дедифференцировки различие в содержании цитокинов между интактными и остеокмитированными МСК сохранилось для 4 аналитов, причем разница для GRO α не изменилась, для MCP-3 и M-CSF удвоилась. Содержание VEGF-A после в остеокмитированных МСК после отмены остеогенных стимулов выросло и превысило содержание в интактных в 2 раза.

Таким образом, 7-дневная остеогенная дифференцировка МСК стимулировала секрецию хемокина GRO α и фактора роста M-CSF, и ингибировала секрецию факторов роста VEGF-A, TNF α , TNF β , цитокинов MCP-1, MCP-3, IL-13, эотаксина и RANTES. Дедифференцировка МСК нивелировала изменения секреции эотаксина, RANTES, TNF α , TNF β , MCP-1 и IL-13, увеличила изменения в секреции MCP-3 и M-CSF и не повлияла на разницу в содержании GRO α между остеокмитированными и интактными МСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-29-04026).

ВОССТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ ПРИ КОМБИНАТОРНОЙ ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПИСТОРХОЗА С ПОМОЩЬЮ ПРАЗИКВАНТЕЛА И АНТИОКСИДАНТОВ

О. Г. Запарина^{1, *}, М. Ю. Пахарукова¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: zp.oksana.93@gmail.com

Трематодами во всем мире заражено более 200 млн человек. На территории России основным трематодозом является описторхоз, вызываемый *Opisthorchis felinus* (кошачья двуустка). Это заболевание сопровождается структурно-функциональными нарушениями в печени, включая развитие таких серьезных вторичных заболеваний как холангит, холецистит и желчнокаменная болезнь. Основным препаратом для лечения описторхоза и других трематодозов человека является празиквантел (PZQ). Несмотря на отсутствие тяжелых побочных эффектов при его применении, существуют противоречивые данные о токсичности этого препарата для человека, так, в некоторых странах Европы PZQ не был разрешен к применению для людей.

Поскольку не существует эффективных аналогов (PZQ), необходим поиск дополнительных препаратов для комбинаторной терапии при описторхозе. Антиоксиданты, за счет снижения уровня активных форм кислорода и улучшения антиоксидантной системы организма, могут снижать повреждение тканей и хроническое воспаление при гельминтозах.

С целью исследования комбинаторного эффекта антиоксидантов (ресвератрол и SkQ1 (-10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium)) при совместном применении с празиквантелом исследовали структуру и функцию печени на экспериментальной модели сирийских хомячков *M. auratus*. В частности, с помощью количественного гистологического анализа через 1 месяц после инфекции оценивали состояние паренхимы печени (дистрофия), воспаление, пролиферацию желчных протоков, перидуктальный фиброз и гиперплазию холангиоцитов; накопление нейтральных липидов и гликогена. С помощью биохимического анализа сыворотки крови оценивали функциональное состояние печени. Экспрессию генов воспаления (*Tnf α* , *Alox5*, *Inos*) и фиброгенеза (*Ck7*, *α SMA*, *Tgf β*) оценивали с помощью ПЦП с детекцией в режиме реального времени. Уровень окислительного стресса оценивали с помощью иммуногистохимического окрашивания на 4-гидрокси-2-ноненьаль в печени.

У неинфицированных животных, получавших PZQ, были отмечены значительные дистрофические изменения в паренхиме печени, повышенное накопление липидов и гликогена, что сопровождалось значимыми изменениями уровней ферментов печени в сыворотке. Эти изменения могут свидетельствовать о токсичном воздействии препарата на печень. В группе инфицированных и пролеченных PZQ животных этот эффект был наиболее выражен. Антиоксиданты ресвератрол и SkQ1 значительно снижали гиперплазию холангио-

цитов, пролиферацию желчных протоков, фиброз, накопление липидных капель и гранул гликогена, что свидетельствовало о восстановлении структуры печени.

Таким образом, комбинация празиквантела с антиоксидантами ресвератролом и SkQ1 снижает неблагоприятное воздействие PZQ на паренхиму печени, что свидетельствует о перспективности применения антиоксидантов в комплексной терапии описторхоза.

Работа поддержана РФФИ и правительством Новосибирской области (22-24-20010).

ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЮЧЕВЫХ АМИНОКИСЛОТ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА OCT4, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИЮ OCT4-SOX2 В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ

А. С. Зиновьева^{1,2,*}, М. Н. Гордеев², Е. Е. Петренко^{1,2}, Е. И. Бахмет², А. Н. Томилин²

¹*Санкт-Петербургский государственный университет, Россия*

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

**E-mail: a.zinoveva@incras.ru*

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) отличаются способностью к самообновлению, а также к дифференцировке во все типы соматических клеток и в половые клетки. Одним из ключевых транскрипционных факторов, управляющим плюрипотентным состоянием, является Oct4. Он относится к V классу POU-доменных белков и в ПСК выполняет свои функции в комплексе с другим транскрипционным фактором – Sox2, представителем SoxB класса. Гетеродимеризация данных факторов является обязательным условием индукции плюрипотентности. Напротив, POU-доменные белки других классов *in vivo* склонны к образованию гомодимеров и действуют независимо от белков SoxB класса.

Мы предполагаем, что приобретение POU-доменными белками V класса способности гетеродимеризоваться с белками SoxB класса связано с двумя аминокислотами в зоне контакта POU-домена с HMG-доменом. Лейцин-16 и Лизин-19 характерны исключительно для V класса, и у остальных классов в данных позициях находятся Фенилаланин-16 и Аргинин-19. Замены лейцина на фенилаланин (L16F) и лизина на аргинин (K19R) могут привести к диссоциации комплекса Oct4–Sox2. При этом, сам Oct4 может перестать работать как фактор плюрипотентности, но стать фактором нейроэктодермального направления, как его ближайшие гомологи из III класса.

Для проверки гипотезы мы использовали метод репрограммирования мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ) с помощью полицистронной кассеты, содержащей Oct4 с заменами K19R&L16F и другие репрограммирующие факторы (Sox2, Klf4, cMyc). В случае с указанными заменами мы наблюдали образование большого количества колоний индуцированных нейрональных стволовых клеток. Предварительные данные указывают на важную роль аминокислот L16 и K19 в обеспечении димеризации Oct4–Sox2 и, как следствие, на механизм работы Oct4 в контексте поддержания плюрипотентности.

Исследование позволит улучшить понимание механизмов, которые управляют плюрипотентным состоянием.

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА В ИНСУЛИНПРОДУЦИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ

Н. Ибрагим^{1,2,*}, А. В. Андрианов³, Р. Е. Израилов³, А. В. Тимофеев², Э. Б. Дашинимаев^{1,2}

¹*Московский физико-технический институт, Москва, Россия*

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

³*Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова, Москва, Россия*

**E-mail: nour9921@gmail.com*

Сахарный диабет 1 типа (СД1) обусловлен аутоиммунной деструкцией β-клеток поджелудочной железы, которая приводит к абсолютному дефициту инсулина и, как следствие, к хронической гипергликемии и другим метаболическим нарушениям. Общепринятым способом лечения СД1 является инсулинотерапия. Эта, по сути дела симптоматическая, терапия хорошо компенсирует дефицит инсулина, но не может полноценно имитировать физиологический механизм регуляции обмена глюкозы. Поэтому у большинства больных СД1 со временем развиваются тяжелые осложнения: ретинопатия, нейропатия, нефропатия.

Настоящим патогенетическим методом лечения СД1 считается трансплантационная терапия, нацеленная на восстановление нормального количества β-клеток. Уже давно и успешно применяется интрапортальная аллотрансплантация целых человеческих островков, получаемых из поджелудочных желез посмертных

мультиорганных доноров. Однако массовое применение этого метода невозможно из-за нехватки донорских островков. В связи с этим активно разрабатываются способы получения инсулинсекретирующих клеток, пригодных для трансплантационной терапии СД1. Для создания таких клеток применяются самые разные методы, прежде всего индукция трансдифференцировки *in vitro* нормальных человеческих клеток экто- и энтодермального происхождения и направленная дифференцировка *in vitro* эмбриональных стволовых клеток и стволовых клеток взрослого человека, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. В этой области достигнуты значительные успехи, но протоколы трансдифференцировки и направленной дифференцировки пока еще несовершенны, поскольку эти процессы зависят от множества сложнейших взаимодействий генов, транскрипционных факторов, факторов роста и малых молекул, которые в норме контролируют специфические направления дифференцировки предшественников островковых клеток.

Мы выдвинули гипотезу о том, что для процесса трансдифференцировки *in vitro* может быть предпочтительнее начинать с клеток, которые имеют “топическое” родство с предшественниками β -клеток. Мы выделили мезенхимальные клетки из стромы поджелудочной железы человека, получили из этих клеток иммортализованную клеточную линию и охарактеризовали ее с помощью ПЦР и иммуноцитохимического окрашивания. Используя различные протоколы дифференцировки, нам удалось получить клетки, секретирующие инсулин и экспрессирующие другие маркеры β -клеток, такие как PDX1, NKX6.1, NKX2.2 и FOXa2. Однако наши клеточные культуры секретируют не только инсулин, но и другие гормоны поджелудочной железы, в частности соматостатин и глюкагон, что указывает на необходимость дальнейшей оптимизации наших методов трансдифференцировки.

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ МЫШИ

М. В. Каримова*

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

**E-mail: maryanna_karimova@mail.ru*

В настоящее время крайне остро стоят проблемы, связанные с сахарным диабетом и методами его терапии. Наиболее перспективным подходом лечения диабета является клеточная терапия с использованием инсулин-продуцирующих клеток, полученных из стволовых клеток (ЭСК или ИПСК) или иммортализованных клеток.

Данная работа включает в себя разработку метода выделения эмбриональных панкреатических островков мыши, их длительное поддержание в культуре и трансдукцию лентивирусными векторами с иммортализирующими агентами hTERT и CDK4.

Выделение островков проводилось на стадии E18,5 (18.5 сут эмбрионального развития) с использованием коллагеназы IV. Разработанный метод позволяет получить до 20 островков с одного эмбриона мыши. Стадия E18,5 была выбрана исходя из анализа эмбрионального развития. На этой стадии все типы клеток панкреатических островков дифференцированы (Jørgensen et al., 2007). Были опробованы несколько методик культивирования островков, и выбрана наиболее подходящая. Эмбриональные панкреатические островки мыши возможно поддерживать в культуре в течение более 30 дней. Существует некоторое количество линий иммортализованных β -клеток, однако их источниками обычно являются инсулиномы, то есть опухолевые клетки, обладающие нежелательными свойствами для трансплантации (Green et al., 2018). Поэтому было принято решение использовать вирусные векторы для доставки генов hTERT и CDK4 для иммортализации клеток панкреатических островков.

Иммортализованные линии являются удобными клеточными моделями для изучения функций клеток, в том числе инсулин-продуцирующих. Данное исследование может стать предпосылкой к изучению специфических свойств клеток и первой ступенью к более полному пониманию человеческих клеток панкреатических островков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Green A.D., Vasu S., Flatt P.R. 2018. Cellular models for beta-cell function and diabetes gene therapy. *Acta Physiol. (Oxf)*. V. 222.

Jørgensen M.C., Ahnfelt-Rønne J., Hald J., Madsen O.D., Serup P., Hecksher-Sørensen J. 2007. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr. Rev.* V. 28. P. 685.

НОВЫЙ ПОДХОД К СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЭКСКРЕТОРНО-СЕКРЕТОРНОГО ПРОДУКТА ОПИСТОРХИД

А. В. Ковнер^{1,*}, О. Г. Запарина¹, А. А. Тарасенко^{1,2}, В. А. Мордвинов¹, М. Ю. Пахарукова¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*E-mail: anya.kovner@gmail.com

Регенерация кожи является гомеостатическим процессом, однако в ряде случаев могут развиваться хронические незаживающие раны или патологические рубцы. Такая ситуация характерна для следующих состояний: глубокие механические повреждения, тяжелые ожоги, пожилой возраст, ожирение, заболевания системы кровообращения, сахарный диабет и другие аутоиммунные заболевания. В настоящее время коррекция длительно незаживающих ран крайне затруднена. В связи с этим поиск новых неспецифических стимуляторов регенерации кожи представляется весьма актуальным.

Трематода *Opisthorchis felineus* поражает гепатобилиарную систему рыбоядных млекопитающих. Эти паразиты способны уменьшать острое воспаление, а также вызывать как повреждение, так и пролиферацию холангиоцитов желчных протоков. Исходя из этого, целью исследования является изучение свойств белков *O. felineus* как ранозаживляющего средства на модели поверхностных ран у мышей.

80 мышам-самцам линии С57Bl/6 были нанесены поверхностные раны диаметром 8 мм. Далее животные были разделены на 8 групп: контрольную (хлоргексидин, 1.5% метилцеллюлоза, BSA) и опытную (ЭСР: 1 мкг, 10 мкг, без эндотоксина 10 мкг; лизат: 10 мкг, 50 мкг). Животным обрабатывали раны каждые 3 дня с определением площади повреждения. Животных выводили из эксперимента на 7 и 10 день лечения. Образцы поврежденной кожи забирали для гистологического исследования и для оценки экспрессии генов. Также проводили протеомный анализ экскреторно-секреторного продукта (ЭСР) и лизата *O. felineus*.

Белки ЭСР и лизата *O. felineus* увеличивали заживление ран у мышей по сравнению с контрольными группами. При гистологическом исследовании было показано, что застание ран у опытных групп сопровождалось уменьшением площади воспалительного инфильтрата, по сравнению с контрольными. На 10 сут эксперимента в опытных группах отсутствовала влажная корка, а в группах, обработанных лизатом *O. felineus* детектировали полную реэпителизацию. Также к 10 сут в группах лечения диагностировано увеличение количества новообразованных сосудов CD34+, что свидетельствует об улучшении трофики тканей.

По результатам анализа экспрессии генов-маркеров воспаления (*Bl 4, Nos2, Arg1*), организации внеклеточного матрикса (*Acta2, Col1a, Col3, MMP9, Tgfβ, FGF2, Fn1*), сосудов (*VEGFα*) и нервной ткани (*NGF, Nestin, NG2*) при обработке ран лизатом и белками ЭСР трематоды *O. felineus* все вышеперечисленные процессы завершаются быстрее, чем у животных контрольных групп.

Протеомный анализ ЭСР и лизата *O. felineus* выявил среди мажорных белков не только гем-связывающие белки, но и GST, TPX, HDM1 и аннексин A2.

Таким образом, препараты на основе трематод *O. felineus* способствуют более быстрому и лучшему заживлению поверхностных ран на мышинной модели. Характеристики отдельных белков, предположительно участвующих в механизмах ранозаживления, требуют дальнейшего изучения.

Работа поддержана РНФ и правительством Новосибирской области (№ 22-25-20018).

3D-КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СПОСОБСТВУЕТ ПРЕОДОЛЕНИЮ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

О. А. Краснова^{1,2,*}, К. А. Кулакова^{1,2}, М. Г. Мартынова¹, О. А. Быстрова¹, И. Э. Неганова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: olgakrasnova12@yandex.ru

Перспективным направлением современной регенеративной биомедицины является клеточная терапия с применением мезенхимальных стволовых клеток человека (МСКч) для лечения как острых, так и хронических заболеваний. Способность к самообновлению и дифференцировке, секреции противовоспалительных цитокинов и ростовых факторов, а также способность к миграции обуславливают терапевтический потенциал МСКч. Однако процесс накопления достаточного количества клеточной культуры для трансплантации и последующей дифференцировки затруднен клеточным старением в условиях *in vitro*. Культивирование в условиях 3D-сфероидов является одним из подходов для преодоления клеточного старения *in vitro*. Существуют работы, демонстрирующие положительный эффект 3D-культивирования на клетки

в состоянии клеточного старения. Однако какие клеточные механизмы, протекающие в 3D-сфероиде, обеспечивают преодоление клеточного старения, не ясно, так как основное внимание предыдущих работ было уделено изучению свойств 3D-сфероидов, а не механизмам, обуславливающим реювенилизацию клеток. Мы впервые показываем, что морфологические изменения при 3D-культивировании инициируют активацию аутофагии, которая в свою очередь способствует преодолению клеточного старения МСКч. Нами продемонстрировано с помощью метода иммунофлуоресцентного окрашивания, что в 3D-сфероидах снижается паттерн распределения и окрашивания винкулина – основного компонента комплексов фокальной адгезии, но усиливается окрашивание на N-кадгерин и β -катенин, что свидетельствует об усилении межклеточных взаимодействий. Снижение адгезивных свойств в 3D-сфероидах приводит к потере регулярной структуры актинового цитоскелета, впоследствии с помощью метода электронной микроскопии нами показана фрагментация аппарата Гольджи и ядерная локализация mTOR. Удержание основного негативного регулятора аутофагии, mTOR, в ядре способствует усилению процесса аутофагии – усиливается паттерн распределения p62, а также экспрессия генов *TFE3*, *ATG5*, *ATG12*, *ATG16L*, *GABARAPL* и *MAP1LC3B*. Применение хлорокина, ингибитора аутофагии, препятствует преодолению клеточного старения МСКч при 3D-культивировании, что указывает на ключевую роль аутофагии в реювенилизации. Таким образом, данная работа, являясь комплексным молекулярно-биологическим исследованием, расширяет область имеющихся знаний о клеточных процессах протекающих в 3D-сфероидах МСКч и обеспечивающих их реювенилизацию.

Поддержано грантом Минобрнауки РФ (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021) и внутренним грантом ИЦ РАН (И.Э. Неганова).

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ СУБЪЕДИНИЦЫ ИММУНОПРОТЕАСОМЫ $\beta 5i$ /LMP7 НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ В ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТЕВЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЗАВИСИТ ОТ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

А. В. Кузнецов^{1, 2, *}, А. Н. Томилин¹, А. С. Цимоха¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: alsiberia13@gmail.com

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) представляют значительный интерес, как для фундаментальных исследований, так и для регенеративной медицины. Однако в настоящее время, эффективность получения иПСК остается низкой. Известно, что убиквитин-протеасомная система, которая осуществляет ключевую роль в поддержании белкового гомеостаза и регуляции основных клеточных процессов, также является одним из важнейших игроков в поддержании плюрипотентности и в дифференцировке. Показано, что ингибирование активности протеасомы вызывает сильное снижение эффективности репрограммирования эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ). Согласно литературным данным, иммунопротеасома может участвовать в дифференцировке ПСК, также, как и в создании иПСК.

Репрограммирование МЭФ и иПСК осуществляли с помощью вирусной трансдукции четырех факторов Яманаки – Oct4, Klf4, Sox2, c-Мус (OKSM) в двух вариантах бессывороточной среды N2B27: 2i и iCD. Среда N2B27 2i включает лейкемия-ингибирующий фактор (LIF), ингибитор GSK3 киназы (CHIR99021) и ингибитор MEK-киназы (PD0325901), в то время как в N2B27 iCD среде PD0325901 заменен на основной фактор роста фибробластов (bFGF), витамин С и активатор Wnt-сигналинга (LiCl). Для ингибирования активности иммунопротеасом использовали селективный ингибитор иммуносубъединицы $\beta 5i$ /LMP7 – PR957 в количестве 100 нМ. Репрограммирование проводили в течение 14 дней, после чего плюрипотентный статус полученных клонов иПСК подтверждали иммуноцитохимически с помощью первичных антител на фактор плюрипотентности Nanog. Мы показали, что ингибирование активности иммуносубъединицы $\beta 5i$ /LMP7 в среде N2B27 2i существенно подавляло способность МЭФ к репрограммированию в иПСК. Однако в среде N2B27 iCD ингибирование активности $\beta 5i$ /LMP7 не столь выражено снижало эффективность клонообразования иПСК. Известно, что ранние этапы репрограммирования сопровождаются усиленной продукцией активных форм кислорода. Поскольку для иммунопротеасомы показана роль в деградации окисленных белков, можно предположить, что наблюдаемый нами эффект связан с наличием в среде iCD витамина С, обладающего антиоксидантными свойствами и способного компенсировать инактивацию в клетках иммуносубъединицы $\beta 5i$.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 19-29-04117).

3D-СИСТЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ/СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МАТРИЦ

И. К. Кунеев^{1,2,*}, Ю. С. Иванова¹, А. П. Домнина¹, О. Г. Люблинская¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: kunejev@mail.ru

Разработка трехмерных (3D) систем культивирования мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (МСК) является перспективным направлением регенеративной медицины. Культивирование МСК в составе простых трехмерных систем – клеточных агрегатов (сфероидов) – существенно повышает их терапевтический потенциал за счет увеличения уровня секреции противовоспалительных и ангиогенных факторов. В свою очередь, 3D-культуры на основе скаффолдов (матриц) активно используются при создании тканеподобных клеточных систем. Культивирование внутри объемной матрицы обеспечивает формирование естественного микроокружения и позволяет моделировать межклеточные взаимодействия, наиболее приближенные к наблюдаемым *in vivo*. Тем не менее, изучению фундаментальных характеристик стволовых клеток, помещенные в 3D-структуры, уделяется мало внимания. В связи с этим большое значение приобретает исследование поведения МСК в 3D-системах *in vitro* и *in vivo*.

Для изучения морфологических и функциональных свойств МСК в 3D-конфигурации в рамках настоящей работы были использованы мезенхимальные стволовые/стромальные клетки человека, полученные неинвазивно из десквамированного эндометрия менструальной крови (ЭМСК). В качестве материала для создания скаффолда была выбрана целлюлоза, обладающая такими важными качествами, как биосовместимость, биологическая инертность, механическая прочность, оптическая прозрачность и доступность получения. Трехмерные матрицы были созданы на основе децеллюляризованного мезокарпия яблок, а их модификация для повышения клеточной адгезии производилась путем обработки коллагеном. Для анализа клеток методом проточной цитометрии нами была разработана методика, позволяющая извлекать их из матрицы. В исследованиях использовались ЭМСК, экспрессирующие генетически-кодированный флуоресцентный биосенсор перекиси водорода НuPer, что позволило отслеживать морфологические особенности и метаболическую активность клеток. Мы показали, что ЭМСК, инкорпорированные в целлюлозные матрицы, остаются жизнеспособными в течение по крайней мере месяца. Кроме того, клетки в скаффолде сохраняют пролиферативную активность и фенотип, характерный для ЭМСК в стандартной монослойной культуре, однако было отмечено снижение уровня экспрессии поверхностного маркера клеточной адгезии CD146. Также, мы показали, что ЭМСК при культивировании на целлюлозной матрице не теряют способность к тканеспецифической дифференцировке в децидуальные клетки.

К настоящему времени с помощью оригинальной методики удалось также создать гибридную 3D-систему, интегрировав сфероиды ЭМСК в коллагенизированный скаффолд. Предварительные эксперименты по трансплантации данной модели животным с последующим извлечением позволили разработать подходы к изучению особенностей поведения 3D-культур ЭМСК при помещении их *in vivo*.

НОВЫЕ АСПЕКТЫ И МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ ПОСТНАТАЛЬНЫХ МСК ЧЕЛОВЕКА В РЕГЕНЕРАЦИИ: ВКЛАД КОНДЕНСИРОВАННОГО СОСТОЯНИЯ И ЭНДОГЕННЫХ ФАКТОРОВ, ПРЕПЯТСТВУЮЩИХ ФИБРОЗУ

П. И. Макаревич^{1,2,*}, П. П. Нибирицкий^{1,2}, Р. Ю. Еремичев¹, Н. А. Александровская^{1,2}, В. А. Ткачук^{1,2}

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

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

*E-mail: pmakarevich@mc.msu.ru

Заживление тканей и органов человека после повреждения является достаточно хорошо изученным процессом, однако остается открытым вопрос о клеточных и молекулярных механизмах, определяющих исход в эпиморфную регенерацию или репаративный фиброз. Среди клеток-эффекторов, активируемых при повреждении, значимую роль играют клетки стромы мезенхимного происхождения (МСК), обнаруженные практически во всех тканях организма. Их вовлеченность в ранозаживление и определение его исхода убедительно показана, и в настоящий момент для регенеративной медицины интерес вызывают возможности модуляции их активности для уменьшения фиброза, ускорения репарации или воссоздания нативной структуры поврежденной ткани.

Нами активно исследовались как автономные свойства МСК (т.е. те, которые обусловлены их тканевым происхождением и стойко сохраняются в культуре), так и их взаимодействие с регуляторным окружением,

сопровождаящим заживление поврежденной ткани. При этом нами был установлен ряд интересных свойств, которые МСК проявляют в культуре и которые могут быть основой для дальнейшей модуляции их регенераторных свойств.

Нами было обнаружено, что МСК сохраняют способность к конденсации, т. е. спонтанному образованию компактизированной клеточной массы при сборке тканеинженерных конструкций в виде пластов. Более того, при этом оказалась усиленной их локальная способность к дифференцировке в кость и хрящ (но не в жир), т.е. в ткани, для развития и регенерации которых критично конденсированное состояние мезенхимных клеток. Транскриптомный анализ показал, что при этом значительно растет активность путей, связанных с малыми ГТФазами Rho, вследствие чего снижается активность транскрипционного фактора SREBP необходимого для полноценного адипогенеза. Таким образом, мы впервые показали, что морфогенетическая программа МСК, направленная на их конденсацию, является автономным свойством, сохраняемым в культуре, и установили важность этого перехода для их коммитирования в остео- и хондрогенном направлении.

Вторым важным наблюдением стали результаты исследования взаимодействия МСК из менструальной крови (по сути, выделяемых из эндометрия), с растворимыми факторами, выделяемыми при менструации. Интерес к этому объекту связан с тем, что эндометрий заживает без рубцевания и представляет собой уникальный случай многократного повреждения и эпиморфной регенерации у человека в каждом менструальном цикле. Мы обнаружили, что критический для фиброзирования этап перехода МСК в миофибробласты может подавляться растворимыми факторами менструальной крови, но не сыворотки периферической крови. Данный эффект наблюдался не только в культурах МСК эндометрия, но и МСК дермы или жировой ткани, для которых характерно фиброзирование после травмы. Таким образом, взаимодействие между резидентными МСК и факторами, выделяемыми в зоне повреждения, оказалось одним из важных звеньев, вероятно, опосредующих регенерацию ткани. Дальнейшим этапом может стать идентификация этих факторов и выяснение механизма их действия.

Таким образом, МСК, обладая автономными свойствами, заданными в ходе развития ткани или органа, характеризуются двумя ключевыми чертами: 1) способностью к спонтанной конденсации *in vitro*, которая напоминает процессы конденсации мезенхимы в эмбриогенезе, и, вероятно, может вносить вклад в регенерацию плотных структур (костей или хряща) и 2) чувствительностью к эндогенным растворимым ингибиторам трансформации МСК в миофибробласты, природу которых еще предстоит выяснить. Все это позволит предложить новые методы стимуляции регенеративных процессов, основанные на формировании тканеинженерных конструкций или идентификации новых мишеней, чья активность препятствует фиброзу поврежденной ткани.

Работа была выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова и по перспективному направлению научно-образовательного развития Московского университета “Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология” В ходе работы использовано оборудование, закупленное в рамках Программы развития МГУ, а также биоматериал человека из коллекции МГУ, сформированной в рамках проекта РФФ “Ноев ковчег”.

МЕХАНИЗМЫ УПРАВЛЕНИЯ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ: ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ НАУКИ К ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А. Б. Малашичева*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

**E-mail: malashicheva@incras.ru*

Остеогенная дифференцировка мезенхимных стволовых клеток — это многоступенчатый процесс, протекающий сходным образом в норме при развитии костной ткани, и при патологиях таких, как кальцификация сосудов и клапанов сердца. Показана роль отдельных генов и сигнальных каскадов в формировании костной ткани, сопутствующем ангиогенезе, а также в патогенезе ряда заболеваний, связанных с нарушением остеогенной дифференцировки. В то же время, ранние инициаторные механизмы остеогенной дифференцировки все еще остаются нераскрытыми. Также неясным остается вопрос о том, протекает ли дифференцировка мезенхимных стволовых клеток различного происхождения сходным образом.

В работе использовали первичные культуры МСК человека следующего происхождения: жировая ткань, пупочный канатик, бедренная кость, пульпа зуба, связка зуба, гингивальные фибробласты. В качестве источника патологической остеогенной дифференцировки использовали интерстициальные клетки аортально-

го клапана пациентов с кальцинирующим аортальным стенозом. Остеогенную дифференцировку МСК индуцировали классическим коктейлем остеогенных факторов (дексаметазон, глицерофосфат кальция и аскорбиновая кислота) и анализировали транскриптомный и протеомный профили дифференцированных и недифференцированных клеток.

Роль эндотелиальных клеток в остеогенной дифференцировке изучали при контактном и бесконтактном культивировании эндотелиальных клеток пуповинной вены с остеобластами человека. После совместного культивирования клеток при индукции остеогенной дифференцировки также анализировали протеомный и транскриптомный профили культур с целью выявления дифференциально экспрессирующихся генов в разных условиях культивирования.

Результаты проведенных исследований приводят к выводу о том, что на молекулярном уровне остеогенная дифференцировка МСК различного происхождения регулируется неодинаково. Патологическая дифференцировка клеток аортального клапана также отличается от дифференцировки нормальных клеток в остеогенном направлении. Показана критическая роль контакта эндотелиальных клеток с МСК в процессе остеогенной дифференцировки и также продемонстрирована ключевая роль сигнального пути Notch при остеогенной дифференцировке МСК в присутствии эндотелиальных клеток.

Проведенные исследования демонстрируют возможность управления остеогенной дифференцировкой при помощи модификации эндотелиальных клеток, направляющих дифференцировку МСК, как в сторону усиления дифференцировки, так и в сторону ее подавления, что указывает на возможность разработки “терапевтического эндотелия” путем модификации его свойств в отношении влияния на остеогенную дифференцировку.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации по поддержке ведущих научных школ НШ-4664.2022.1.4.

ВЛИЯНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ МИЕЛОИДНОГО РОСТКА КОСТНОГО МОЗГА КРЫС

Е. А. Маркина¹, В. Е. Ерофеева^{1,*}

*¹Государственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

**E-mail: vikaerofeeva01@mail.ru*

Длительные космические полеты сопряжены с воздействием таких факторов, как микрогравитация, ионизирующее излучение и аэрозоль токсических химических веществ. Летучие органические соединения, источниками которых являются неметаллические материалы космических станций, системы жизнеобеспечения, продукты метаболизма человека и др., в основном представлены спиртами, фталатами, альдегидами и ароматическими углеводородами. Показано, что бензол и его метаболиты, а также этанол, ацетальдегид и ацетон оказывают неблагоприятное воздействие на организм, в том числе на костный мозг, что клинически выражается анемией, различными цитопениями и, возможно, лейкозами как отдаленными последствиями.

Целью нашей работы было изучение влияния 15-суточного воздействия химических агентов на миелоидные предшественники костного мозга крыс линии Wistar.

Моделирование воздействия химических веществ было проведено с помощью испытательного стенда для санитарно-химических и токсикологических исследований (УМБИ-1) в лаборатории “Санитарно-химической безопасности и токсикологии воздуха герметичных помещений” ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Затравочная смесь состояла из ацетона, ацетальдегида и бензола в концентрациях соответственно 0.7–1.5; 0.9–1.4 и 0.2–0.4 мг/м³, что не превышало предельно допустимых концентраций (ПДК). Для оценки функциональной активности гемопоэтических предшественников были использованы селективные полутвердые среды MethoCult™ для эритроидного (M3436) и гранулоцитарно-моноцитарного (R3774) ростков кроветворения. Было выявлено уменьшение числа и площади колоний БОЕ-Э и КОЕ-ГМ после воздействия токсических агентов.

Таким образом, аэрозоль летучих органических соединений в концентрациях, не превышающих ПДК, оказывает негативное воздействие на дифференцировочный и пролиферативный потенциал гемопоэтических предшественников миелоидного ростка кроветворения, что позволяет предложить пересмотр существующих норм ПДК.

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН № 65.3.

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА SOX9 НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ХОНДРОГЕНЕЗА В ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТАХД. М. Марченко^{1, 2, *}, М. С. Божокин^{2, 3}, Е. Р. Михайлова², Ю. В. Сопова^{1, 2, 4}¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия³Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Вредена, Санкт-Петербург, Россия⁴Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия*E-mail: berbimot@yandex.ru

Проблема повреждения суставов является актуальной для миллионов людей. Поверхностный слой гиалинового хряща обладает ограниченной способностью к регенерации, поэтому даже небольшие его дефекты приводят к дальнейшей деградации ткани. Одним из принципиально новых и перспективных подходов по восстановлению гиалинового хряща является применение клеточно-инженерных конструкций (КИК), которые представляют собой клеточную культуру, помещенную внутрь биодеградируемого носителя. Примечательно, что восстановление поверхности гиалинового хряща клеточно-инженерным методом возможно проводить с использованием аллогенных клеток, например, дермальных фибробластов. Преимуществами данной клеточной культуры являются их доступность, подверженность модификациям и неиммуногенность. Для более эффективного действия КИК необходимо модифицировать фибробласты в хондрогенном направлении, например, с помощью рекомбинантных белков. В качестве такого рекомбинантного белка может выступать SOX9, важнейший транскрипционный фактор хондрогенеза.

Цель данной работы заключалась в исследовании влияния рекомбинантного белка SOX9 на индукцию экспрессии генов хондрогенеза в дермальных фибробластах.

В исследовании использовали клеточную культуру дермальных фибробластов человека линии DF2, полученную из ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных” ИИЦ РАН. Фибробласты модифицировали посредством рекомбинантного белка SOX9 в концентрациях от 1 до 20 нг/мл. Белки добавляли к клеткам при каждой смене среды. Фибробласты инкубировали в течение 7, 14 и 21 дней в стандартных условиях. Далее из клеток выделяли РНК с помощью коммерческого фенол-содержащего реагента согласно протоколу производителя. Затем РНК использовали в реакции обратной транскрипции и получали комплементарную ДНК. Эффективность модификации фибробластов анализировали по мере изменения экспрессии генов, ответственных за хондрогенез (*tgfb3*, *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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

По результатам проведенного исследования было выявлено, что добавление в среду рекомбинантного белка SOX9 статистически не влияет на изменение экспрессии как генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса гиалинового хряща (*acan*, *col2a1*, *comp*), так и генов, кодирующих индукторы хондрогенеза (*tgfb3*, *sox9*). Обнаруженное явление требует дальнейших исследований, однако может быть обусловлено неспособностью SOX9 в виде рекомбинантного белка проникать внутрь клетки и/или внутрь ядра.

Таким образом, действие рекомбинантного белка SOX9 на культуру дермальных фибробластов является малозначительным. Следовательно, использование данного транскрипционного фактора для хондрогенной модификации фибробластов представляется возможным с применением других методов, например генно-инженерных.

ПРОТЕОМ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРИ РАЗЛИЧНОМ УРОВНЕ O₂Д. К. Матвеева^{1, *}, Д. Н. Каширина¹¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*E-mail: matveeva.dajana@yandex.ru

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) *in vitro* синтезируют значительное количество внеклеточного матрикса (ВКМ) с различным составом структурных и регуляторных компонентов. Взаимодействие клеток с ВКМ является двунаправленным, поэтому условия, при которых культивируются МСК, могут влиять на ремоделирование продуцируемого ВКМ. Целью данной работы было изучить белковый состав децеллюляризованного ВКМ (дцВКМ) от МСК, культивируемых при различном уровне O₂.

Для получения ВКМ МСК культивировали при 20 и 5% O₂ в течение 14 дней с добавлением аскорбата натрия. Далее проводили децеллюляризацию (0.5% Triton-X100 в PBS + 20 mM NH₄OH при 37°C в течение 5 мин) с последующей экстракцией белков ВКМ, растворимых в мочеvine (2M мочеvine в 150 mM растворе NaCl с добавлением ингибиторов протеаз). Для анализа белкового состава экстрагированного дцВКМ использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Анализ проводили с помощью программы MaxQuant с последующей идентификацией белков по базе данных SwissProt.

Протеомный анализ экстрагированной мочеvineй фракции идентифицировал около 80 белков ВКМ, которые были количественно и качественно сравнены в двух группах. Было выявлено, что в 5% O₂-дцВКМ по сравнению с 20% O₂-дцВКМ снижались многие адгезивные гликопротеины (фибронектин, витронектин, остеоонектин, тенасцин, нидоген-2, спондин-1, фибулин-1), но при этом увеличивались тромбоспондины 1,2,4, также отвечающие за взаимодействие ВКМ-клетка. В 5% O₂-дцВКМ уменьшалось количество эластина и эластин-ассоциированных белков (фибулин 2,4,5, эмилилин-1, MFAP-5). Среди коллагеновых белков в обеих группах обнаружены коллагены типа 1A1, 1A2, 3A1, 5A1-2, 6A1-A3, 12A1, 14A1, 16A1. При этом для 20% O₂-дцВКМ было характерно увеличенное количество ретикулярного Col3A1 и ассоциированного с ним Col16A1, а для 5% O₂-дцВКМ – фибриллярного Col5A1 и адгезионного Col14A1. Кроме того, в 5% O₂-дцВКМ отмечено большее количество белков, отвечающих за организацию коллагеновых фибрилл (P4HA1, SERPH, AEBP1, FMOD, TGM2, тенасцин-X, бигликан). В обеих группах отмечено содержание белков ВКМ, взаимодействующих с эндотелием (тенасцин-A, PGBM, ECM1, LEG3), при этом в 5% O₂-дцВКМ было отмечено значительное увеличение одного из участников регуляции ангиогенеза (SRPX2) и факторов роста FGF2 и CTGF. Среди других биологически активных молекул, депонированных в дцВКМ, выявлены гремлины: увеличенные GREM1 и GREM2 в 20-дцВКМ и в 5-дцВКМ, соответственно. Только в 5% O₂-дцВКМ обнаружены белки ВКМ хрящевой ткани: адамализин (ATS3)-протеаза пропептидов коллагена 2 типа, регуляторный CILP1, и увеличенное количество хрящевого протеогликана (HPLN1), что свидетельствует о более выраженном хондро-потенциале МСК при 5% O₂.

Полученные данные об особенностях белкового состава в 20- и 5% O₂-дцВКМ могут быть востребованными для прогнозирования их влияния на функциональную активность клеток при последующей рецеллюляризации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 21-75-10117).

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ОЦЕНКЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

А. О. Монакова^{1,2,*}, Г. Д. Сагарадзе², Н. А. Басалова², В. С. Попов¹, В. Ю. Балабаньян^{1,2}, А. Ю. Ефименко^{1,2}

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

²Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: monakova-anyu@mail.ru

Идиопатическое мужское бесплодие распространено и плохо поддается лечению, что определяет необходимость поиска новых терапевтических подходов. В доклинических исследованиях нами было показано, что локальное введение секретом мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека способствует восстановлению сперматогенеза на моделях *in vivo*. Однако переход на стадию клинического исследования затруднен из-за отсутствия стандартизованных методов оценки такого показателя качества как специфическая активность, который должен отражать механизм действия препарата.

Ранее мы показали, что секретом МСК стимулирует секрецию тестостерона клетками Лейдига *in vitro*, что легло в основу разработки метода оценки специфической активности.

Для разработки модели специфической активности клетки Лейдига были выделены из яичек здоровых крыс. На 2-й день к клеткам Лейдига добавляли секретом МСК, а на 4-й день с клеток собирали среду, в которой измеряли концентрацию тестостерона иммуноферментным методом (ИФА). В качестве контрольных образцов использовали среду с клеток Лейдига на 2-й и 4-й день без секретом МСК.

Мы показали, что секретом МСК стимулирует секрецию тестостерона клетками Лейдига. Для оценки возможности перехода к инструментальным методам анализа от сложных биологических методик, мы проанализировали вклад отдельных факторов секретом в описанные выше эффекты. Из литературных данных известно, что среди основных факторов секретом МСК VEGF стимулирует клетки Лейдига продуцировать

тестостерон *in vitro*. Мы предположили, что VEGF может вносить существенный вклад в восстановление сперматогенеза *in vivo* и отражать один из механизмов действия секрета МСК.

В экспериментах *in vitro* мы установили прямую корреляцию между концентрацией VEGF в секрете МСК и уровнем секреции тестостерона клетками Лейдига после нанесения секрета МСК *in vitro*. На мышинной модели повреждения сперматогенеза с помощью введения доксирубина нами был подтвержден вклад VEGF в восстановление сперматогенеза. Общее число сперматозоидов (6.251×10^6) и число подвижных сперматозоидов (0.123×10^6) превышало число сперматозоидов у животных без терапии (0.412×10^6 и 0.0007×10^6) и у животных с инъекцией секрета МСК с АТ к VEGF (0.25×10^6 и 0) через 5 мес. после инъекции. По результатам гистологического анализа между группами животных, которым вводили секретом МСК и секретом МСК с АТ к VEGF, значимых отличий не наблюдали.

Таким образом, мы разработали модель для оценки специфической активности секрета МСК *in vitro*, а также показали, что уровень стимуляции клеток Лейдига коррелирует с концентрацией VEGF в секрете МСК. Можно предположить вклад VEGF в эффективность секрета МСК и использовать VEGF как суррогатный маркер специфической активности секрета МСК в модели нарушения сперматогенеза. Тем не менее, для применения предложенных методов в фармацевтической практике требуется их дальнейшая валидация.

Исследование было выполнено в рамках Государственного задания МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СЕРТОЛИ-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*

В. В. Мун¹*, А. Ю. Кулибин², Е. А. Малолина²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

*E-mail: valeriy2125@gmail.com

Клетки Сертоли (КС) – важные для сперматогенеза млекопитающих соматические клетки. Они расположены в сперматогенном эпителии извитых семенных канальцев яичка и обеспечивающие развитие и защиту половых клеток. Столь важная роль делает КС перспективным объектом для разработок систем *in vitro* сперматогенеза или методик лечения мужского бесплодия, однако пролиферация данного типа клеток в культуре очень затруднена. Таким образом, поиск высокопролиферативного аналога КС является актуальной задачей. В нашей лаборатории, в области сети семенника мыши была обнаружена популяция Сертоли-подобных клеток (СПК). Они обладают схожим с КС профилем экспрессии, более активной пролиферацией, но меньшим уровнем Dmrt1, фактора важного для поддержания КС в дифференцированном состоянии.

Целью текущей работы является разработка методики для оценки функциональной активности мышечных СПК в условиях *in vivo* семенника. Для этого мы, при помощи катионного детергента хлорида бензалкония (ХБ), удаляли КС из извитых семенных канальцев, после чего трансплантировали донорские СПК в обработанный семенник.

Мы инъецировали раствор ХБ в извитые семенные канальцы при помощи стеклянного микрокапилляра. Для подбора оптимальной концентрации детергента была протестирована серия разведений от 0.02 до 0.15%, эффективность которых оценивали на 4 сут после операции. Анализ, проведенный посредством гематоксилин-эозиновой и иммунофлуоресцентной окраски на маркер КС и СПК – Sox9, показал, что эффект от инъекции ХБ заключается в снижении высоты сперматогенного эпителия и гибели КС, при этом оптимальным разведением было выбрано 0.1%. В данном случае, порядка трети канальцев полностью лишаются сперматогенного эпителия и содержат менее 4 КС на срез, большинство же оставшихся канальцев содержат нормальный сперматогенный эпителий, где сохраняются половые клетки и КС. В контрольных образцах среднее число КС на срез – 22. Далее, на 4 сут после инъекции ХБ проводилась трансплантация культуры СПК. Клетки в виде суспензии закапывались в сеть семенника, с последующим анализом на 4, 14 и 28 сут. Было установлено, что СПК остаются жизнеспособными в яичках реципиента как минимум в течение 4-х недель, при этом заполняют свободные от КС семенные канальцы, распластаваясь по базальной мембране. Трансплантированные клетки имеют отсчатую структуру, схожую с нативными КС в сперматогенном эпителии и сохраняют экспрессию типичных для КС транскрипционных факторов, таких как Sox9 и Dmrt1. Pax 8, маркер СПК тоже сохраняет свою экспрессию.

Таким образом, мы получили тестовую систему, которая позволяет оценить функциональную активность СПК в условиях, максимально приближенных к нативным, что может помочь в исследовании взаимодействия ниши сперматогониальных стволовых клеток с соматическими клетками и разработке методов лечения мужского бесплодия.

ВЛИЯНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КРАУДЕРОВ НА ВЫРАБОТКУ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

И. Е. Перевозников^{1,*}, Р. Е. Ушаков², Е. Б. Бузова²

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

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ilyaperevoznikov@gmail.com

Внеклеточный матрикс (ВКМ) представляет собой сложную белковую сеть, которая участвует в регуляции пролиферации, миграции и дифференцировки клеток. Перспективность использования ВКМ в тканевой инженерии и регенеративной медицине обуславливает необходимость поиска методов по повышению продуктивности его выработки клетками. Одним из подходов является использование макромолекулярных краудеров, добавление которых в ростовую среду клеток приводит к увеличению скорости депонирования ВКМ.

Цель данной работы заключалась в изучении влияния ряда краудеров в различных концентрациях на выработку ВКМ мезенхимными стромальными клетками эндометрия человека (эМСК). В доступной нам литературе отсутствуют сведения о роли макромолекулярных краудеров в повышении продуктивности выработки ВКМ этими клетками. Объектом нашего исследования стали полиэтиленгликоль (ПЭГ) 2000, 4000 и 6000, а также фиколл 400. Концентрации веществ подбирали таким образом, чтобы исключенный объем был одинаковым при использовании каждого краудера. Среда с добавлением краудеров содержала 1% сыворотки; эффективность наработки ВКМ сравнивали с клетками, которые культивировали в присутствии 1% и 10% сыворотки в ростовой среде. Через 3 и 7 дней после добавления краудеров проводили децеллюляризацию ВКМ, используя 0.5% раствор TritonX-100 с 20 мМ гидроксида аммония. Методом иммунофлуоресценции анализировали белковый состав ВКМ. Окрашивали на фибронектин, коллаген III и IV типов, которые являются основными компонентами ВКМ. Из полученных результатов можно сделать вывод, что наибольшую эффективность среди всех исследуемых краудеров имеет фиколл 400 в концентрации 50 мг/мл. Наиболее заметные результаты наблюдаются на 3х-дневном матриксе: ВКМ, нарабатанный в присутствии фиколла 400, по эффективности депонирования всех анализируемых белков превосходит таковой в контроле (1% сыворотки). Однако на 7-й день разница между ними становится менее заметной. Среди полиэтиленгликолей высокую эффективность в отношении выработки коллагена III и IV типов показал ПЭГ 4000 в концентрации 25 мг/мл. Таким образом, использование фиколла 400 и ПЭГ 4000 может быть перспективным для оптимизации продукции ВКМ эндометриальными мезенхимными стромальными клетками.

ИЗУЧЕНИЕ ОСТЕОИНДУКТИВНЫХ И ОСТЕОСУПРЕССИВНЫХ СВОЙСТВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ОСТЕОБЛАСТАМИ

Д. А. Переплетчикова^{1,*}, Д. А. Костина¹, В. В. Карелкин², А. А. Лобов¹, А. Б. Малашичева¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²РНИИТО им. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: dasha_perepletch@mail.ru

Мезенхимные стволовые клетки различного происхождения (МСК) и остеобласты обладают высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом. В частности, они способны дифференцироваться в остеогенном направлении *in vivo* и *in vitro*. *In vivo* ключевую роль в определении клеточной судьбы играет клеточная ниша и сигналы, которые мезенхима получает от других клеток, например, эндотелия.

Эндотелий способен индуцировать остеогенную дифференцировку МСК, а взаимодействие эндотелия и мезенхимных клеток является центральным в остеогенезе и ряде заболеваний с избыточной кальцификацией. Однако комплексной картины о молекулярных механизмах влияния эндотелия на остеогенную дифференцировку до сих пор нет.

Цель данной работы состоит в изучении молекулярных механизмов, влияющих на процессы дифференцировки мезенхимных клеток, обусловленных остеоиндуктивным и/или остеосупрессивным эффектом эндотелиальных клеток. Для этого нами была разработана система сокультивирования в условиях бесконтактного взаимодействия и непосредственного контакта двух типов клеток: первичной культуры остеобластов и эндотелиальных клеток пупочного канатика человека. Методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), мы оценивали изменения уровней экспрессии ключевых генов, вовлеченных в остеогенную дифференцировку, (1) в смешанной культуре остеобластов и эндотелиальных клеток, (2) в контрольных культурах остеобластов и эндотелия без сокультивирования, (3) в культурах остеобластов и эндотелия при бесконтактном взаимодействии и (4) в культуре остеобластов и эндотелиальных клеток, разделенных после сокультивирования при помощи магнитного сортирования по эндотелиальному маркеру CD31. Также проводили эксперименты в

присутствии остеогенной среды (100 нМ дексаметазон, 50 мкМ аскорбиновая кислота и 10 мМ бета-глицерофосфат) для индукции дифференцировки. Для оценки остеогенной дифференцировки проводили окраску на выявление кальция во внеклеточном матриксе.

Режим сокультивирования оказывал противоположные эффекты на остеогенную дифференцировку остеобластов – контактное культивирование усиливало, а бесконтактное подавляло остеогенную дифференцировку. Ключевой сигнальный каскад, связанный с контактной передачей сигнала – это сигнальный путь Notch.

При помощи РВ-ПЦР было установлено, что в прямых ко-культурах эндотелиальных клеток и остеобластов как смешанного типа, так и разделенных после сокультивирования при помощи магнитного сортирования, наблюдается активация экспрессии Notch-зависимых генов: *HEY1*, *DLL4*, *JAG*, *SNAIL*, *SLUG* и маркера остеогенной дифференцировки *RUNX2*, в сравнении с контрольными клетками.

Полученные нами данные подтверждают остеоиндуктивные свойства сигнального пути Notch и подчеркивают двойственность влияния эндотелия на остеогенную дифференцировку.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-74-10077).

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОГЕЛЯ НА ОСНОВЕ ДЕЦЕЛЛЮЛИРОВАННОГО МАТРИКСА МОЗГА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ТКАНЕЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

В. И. Першин^{1,2,*}, М. С. Гусева¹, Р. Д. Лапшин¹, И. И. Белоусова¹, В. О. Иванова²,
Е. А. Васильчикова², И. В. Мухина^{1,2}

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*E-mail: bp1995@yandex.ru

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является серьезной проблемой для здоровья человека, и ее последствия могут приводить к инвалидизации населения. В основном она возникает при физическом разрушении мозговой ткани механическими силами. Последствием механического разрушения мозга является запуск каскада вторичных повреждений – активизация процессов окислительного стресса, хронического воспаления, нарушение работы и гибель нейронов. Из-за поражения серого и белого веществ возникают сенсомоторные и когнитивные нарушения. Ввиду невозможности пролиферации нейрональных клеток возникают глиальные рубцы в очаге поражения. Перспективным способом для коррекции нарушений после ЧМТ может являться разработка тканезаместительной терапии с использованием биосовместимого биоматериала, удобного для доставки в зону повреждения мозга, а также обладающего сходными структурой, составом и свойствами с исходной тканью, способствующего подавлению хронического воспаления и стимулирующего миграцию нейрональных прогениторов в зону повреждения. Подходящим кандидатом является использование гидрогеля на основе децеллюлированного матрикса мозга аллогенного происхождения.

Цель работы. Разработка методики получения гидрогеля на основе децеллюлированного матрикса мозга минипигов.

Материалы и методы. В качестве источника биоматериала были использованы минипиги возрастом 4–6 мес., весом 35–45 кг. При приготовлении децеллюлированного матрикса использовался детергентно-энзиматический подход с предварительной инкубацией в деионизованной воде. Фрагмент полученного матрикса фиксировался в параформальдегиде, выполнялась стандартная гистологическая проводка ткани с последующим окрашиванием гематоксилином-эозином и флуоресцентным красителем ядер DAPI. Лиофилизированный матрикс мозга подвергался обработке пепсином для солюбилизации. По окончании инкубации выполнялась нейтрализация pH и осмолярности среды. Для оценки перехода в гелеобразное состояние использовался спектрофотометрический анализ кинетики изменения абсорбции на длине волны 405 нм.

Результаты. В ходе пробоподготовки происходило удаление остатков крови из образца, а также биоматериал приобретал характерную для децеллюлированной ткани полупрозрачность. Окрашивание гематоксилином-эозином и флуоресцентным красителем DAPI выявило отсутствие ядерного и клеточного материала в образце, что свидетельствует о прохождении децеллюляризации. По результатам спектрофотометрического анализа, процесс гелеобразования наблюдался при использовании концентрации раствора гидрогеля от 15 мг/мл и с характерным временем застывания до 40 мин.

Заключение. Примененный комбинированный подход с предварительной инкубацией в деионизованной воде с последующей детергентно-ферментативной обработкой позволяет получить децеллюляризованный матрикс мозга, способный переходить в гелеобразное состояние после обработки пепсином при концентрации от 15 мг/мл в течение 40 мин.

РОЛЬ NANOG В ЭНТОДЕРМАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

Е. Е. Петренко^{1, 2, *}, М. Н. Гордеев², А. С. Зиновьева^{1, 2}, Е. И. Бахмет², А. Н. Томилин²

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

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) отличаются способностью к самообновлению и к дифференцировке во все типы соматических клеток, а также в половые клетки. ЭСК культивируют с добавлением лейкемия-ингибирующего фактора (LIF), они соответствуют плюрипотентному эпибласту эмбриона мыши до имплантации, и называются наивными. После имплантации эмбриона в матке клетки эпибласта становятся восприимчивы к внешним сигналам дифференцировки и называются праймированными. Именно с этого момента, благодаря действию внешних факторов, начинается гастрюляция – дифференцировка клеток в направлении энто-, мезо- и эктодермы. Для моделирования таких процессов в культуре, ЭСК переводят на “праймированную” среду, содержащую bFGF и Activin A, после чего они также становятся восприимчивы к факторам дифференцировки и называются эпибластоподобными стволовыми клетками (ЭпиПК). Nanog – один из ключевых факторов плюрипотентности. Оверэкспрессия этого белка в ЭСК ведет к усиленному плюрипотентному статусу и отсутствию дифференцировки этих клеток даже в отсутствие LIF. Его экспрессия резко снижается во время имплантации эмбриона, но далее возвращается в заднем эпибласте – в месте закладки мезодермы и энтодермы. Примечательно, что Activin/Nodal-сигналинг играет важную роль в регуляции экспрессии Nanog после имплантации, а также необходим для индукции энтодермальной дифференцировки. При этом функция Nanog в данном процессе остается неизученной.

Целью нашего исследования являлось изучение роли Nanog в энтодермальной спецификации ЭСК. В экспериментальной работе мы использовали протокол *in vitro* дифференцировки, максимально приближенный к *in vivo* условиям. ЭСК переводили в праймированные условия, после чего, полученные ЭпиПК дифференцировали в направлении энтодермы путём добавления высокой концентрации Activin A. Как и ожидалось, экспрессия Nanog резко снижалась в ЭпиПК, однако ре-активировалась уже на первый день энтодермальной спецификации. Для выяснения роли Nanog в данном типе дифференцировки был применен метод индуцибельной дегградации белка – экспрессия Nanog оставалась интактной в ЭСК, но была подавлена нами с началом спецификации ЭпиПК. В ходе данных экспериментов было показано, что в отсутствие Nanog дифференцировка в энтодермальном направлении запускается с образованием характерных Foxa2⁺/Sox17⁺ клеток. Однако конечное число этих клеток в случае элиминации Nanog, оказалось в 5 раз меньше, чем в контроле. Таким образом, можно сделать предварительный вывод о том, что Nanog, как минимум, способствует пролиферации клеток в ходе энтодермальной дифференцировки. Также возможно, что этот фактор необходим для поддержания пула недифференцированных предшественников, который с ходом спецификации обеспечивает нужное количество итоговых энтодермальных клеток.

НОКАУТ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ ИММУНОПРОТЕАСОМЫ LMP2 И MECL-1 СОХРАНЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ OSTA4 В РАННЕЙ ЭНТОДЕРМАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ЭСК МЫШИ

У. И. Поденкова^{1, *}, Е. И. Бахмет¹, А. Н. Томилин¹, А. С. Цимоха¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) способны давать начало всем клеточным типам, представленным в организме, что подразумевает существование жесткого контроля над самообновлением, равно как и за сложным процессом клеточной дифференцировки. Это обеспечивается усиленной активностью защитных систем клетки, включая поддержание белкового гомеостаза.

Убиквитин-протеасомная система дегградации белков осуществляет большую часть регулируемого протеолиза в клетке и является одним из ключевых регуляторов многих клеточных процессов. При определенных условиях конститутивные каталитические субъединицы протеасомы могут замещаться на индуцибельные LMP7/PSMB8, LMP2/PSMB9 и MECL-1/PSMB10. В такой конфигурации протеасома называется иммунопротеасомой и принимает участие в процессе презентации антигена при иммунном ответе в составе молекулы MHC-I. За последние годы появились исследования, предполагающие важную роль иммунопротеасомы в поддержании плюрипотентности и в процессе клеточной дифференцировки.

В настоящее время выделяют три устойчивых состояния плюрипотентности ЭСК по мере приближения дифференцировки: раннее (наивные ЭСК), промежуточное и позднее (праймированные ЭСК). Согласно

данным РНК-секвенирования, переход ЭСК мышцы из состояния наивной плюрипотентности в праймированное состояние сопровождается повышенной экспрессией иммунных субъединиц протеасом, что подтверждается нашими экспериментальными данными.

В ходе работы были получены линии ЭСК, несущие нокаут по генам иммуносубъединиц протеасомы PSMB9, PSMB9 и PSMB10. Мы показали, что полученные клеточные линии способны поддерживать плюрипотентное состояние в культуре. В то же время, наблюдаемый нами эффект продолжающейся экспрессии маркера плюрипотентности Oct4 одновременно с маркером дифференцировки Foxa2 при эндодермальной дифференцировке ЭСК, несущих нокаут по генам иммунопротеасомы PSMB9 и PSMB10, может свидетельствовать об их неполной способности дифференцироваться в этом направлении. Таким образом, наши результаты позволяют предположить важную роль иммунопротеасомы на ранних стадиях дифференцировки ЭСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-14-00390).

АНАЛИЗ ПОДВИЖНОСТИ КЛЕТОК ЛИНИИ FetMSC В ПРОЦЕССЕ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ

А. В. Полянская^{1,*}, Д. Ф. Гончарова², А. С. Мусорина¹, Г. Г. Полянская¹, Д. Е. Бобков¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²НИО трансляционной онкологии ФГБУ НМИЦ им. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: polyanskaya.nastya18@gmail.com

Работа направлена на исследование изменений актинового цитоскелета и подвижности мезенхимных стволовых клеток человека (МСК) в процессе репликативного старения. В процессе культивирования неморфализованные линии МСК подвержены репликативному старению (РС). Известно, что нарушения миграционных процессов приводят к ухудшению регенерации тканей. Следовательно, для эффективного использования МСК в восстановительной медицине необходимым предварительным условием является изучение РС-ассоциированных изменений параметров клеточной подвижности. Основными сигнальными регуляторами клеточной подвижности немышечных клеток являются малые ГТФазы семейства Rho. Основным нижестоящим эффектором малой ГТФазы RhoA и регулятором актомиозинового цитоскелета является ROCK1-киназа, которая способствует формированию стресс-фибрилл.

Основной целью работы было исследование влияния ингибитора ROCK1-киназы Y-27632 на цитоскелет и подвижность клеток линии FetMSC процессе РС.

Для изучения аспектов РС, связанных с подвижностью клеток в работе использовали следующие методы: культивирование клеток, конфокальная микроскопия, иммунофлуоресцентное окрашивание, анализ структур актинового цитоскелета и клеточной подвижности.

В работе использовали клеточную линию FetMSC, выделенную из костного мозга эмбриона человека. Линия была получена и охарактеризована в ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных” ИИЦ РАН. Анализ старения клеточных линий проводили методом окраски на активность фермента β-галактозидазы. Доля клеток, имеющих синюю цитоплазматическую окраску, увеличивается с номером пассажа, следовательно, клеточная линия FetMSC подвержена репликативному старению.

Изменения в морфологии актинового цитоскелета, наблюдаемые на изображениях, полученных с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, оценивали методом измерения локальной связанной фрактальной размерности (local connected fractal dimension – LCFD). Параметр LCFD в нашей работе можно рассматривать в качестве косвенной меры организованности такого сложного для описания геометрического объекта, как структура актинового цитоскелета. Прижизненные наблюдения в стрессовых условиях (при культивировании с 1% сыворотки) в течение 24 ч за подвижностью клеток, распластанных на пластике, показали, что в процессе РС средняя скорость клеток FetMSC сначала сильно увеличивается с 9-го по 15-й пассаж (13.0 ± 3.9 мкм/ч до 33.8 ± 6.7 мкм/ч), затем значительно падает к 22-му пассажи (24.4 ± 7.8 мкм/ч). Обнаружено, что воздействие селективным ингибитором ROCK1 (Y-27632) в концентрации 10 мМ приводит к достоверному снижению средней скорости клеток (19.9 ± 5.9 мкм/ч) и уменьшению LCFD только на 22-м пассаже, а на 9 и 15 пассажах не вызывает достоверных изменений.

Таким образом, РС клеточной линии FetMSC сопровождается значительными изменениями в характере клеточной подвижности; на поздних стадиях РС клетки FetMSC становятся более чувствительными к ингибитору ROCK1 (Y-27632).

ИММУНОФЕНОТИП И ПОТЕНЦИАЛ К ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕПЛИКАТИВНОМ СТАРЕНИИ

А. Ю. Ратушный*

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

**E-mail: ratushkin@mail.ru*

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) обладают множеством потенциально полезных свойств, что делает их привлекательным средством терапии в рамках регенеративной медицины. К основным способам идентификации данной клеточной популяции относят оценку иммунофенотипа и мультилинейность дифференцировки. С возрастом все больше клеток организма подвергаются клеточному старению, которое ассоциировано с целым рядом морфофункциональных изменений. Цель нашей работы заключалась в анализе иммунофенотипа и дифференцировочного потенциала сенесцентных МСК. В рамках данной работы использовали модель длительного культивирования клеток до достижения репликативного старения.

Известно, что способность клетки реагировать на внешние сигналы и регулировать свое функциональное состояние определяется репертуаром рецепторов на клеточной мембране. То есть иммунофенотип играет важную функциональную роль во взаимодействии клеток между собой и с внеклеточным матриксом (ВКМ). Известно, что доля МСК, позитивных по основным изучаемым маркерам, не изменяется значительным образом при длительном культивировании и клеточном старении. Тем не менее, количественная представленность рецепторов на клеточной мембране почти не изучалась. Мы показали, что при клеточном старении на поверхности МСК повышается экспрессия CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, HLA-ABC. Достоверных изменений по антигенам CD105 и CD51/61 в экспериментальных условиях не выявлено. При анализе было также учтено влияние размера клеток и аутофлуоресценции. Эти показатели значительно увеличиваются при клеточном старении, что может искажать результаты при оценке изучаемых параметров. Обнаруженные изменения могут лежать в основе ряда модификаций свойств сенесцентных МСК, включая миграцию, адгезию, дифференцировку, иммуномодуляторную и ангиогенную активности.

Одной из важных черт сенесцентных МСК считают снижение мультипотентности, что может ограничивать их репаративные функции в ткани. Мы изучили потенциал к дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях при репликативном старении. Показано снижение адипогенного потенциала, сопровождающееся снижением экспрессии ключевого транскрипционного регулятора *PPARG*. Отмечены признаки, указывающие на реципрокное повышение остеогенного потенциала. Увеличивалась выраженность кальцификации матрикса при дифференцировке. Экспрессия ключевого регулятора остеогенеза (*RUNX2*) и ряда исследуемых маркеров (*SPARC*, *SPPI*, *COL1A1*, *BGLAP*) при репликативном старении МСК оставалась стабильной. В то же время было обнаружено повышение уровня остеопротегерина (*OPG*) в кондиционированной среде сенесцентных клеток. Этот гликопротеин позитивно регулирует сосудистую кальцификацию, увеличивая риски сердечно-сосудистых патологий.

Таким образом, канонические свойства МСК могут в значительной степени изменяться при клеточном старении, что может быть важно с точки зрения регенеративной медицины.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-75-10117).

КВАНТИФИКАЦИЯ ФИБРИЛЛЯРНОГО АКТИНА В КЛЕТКАХ ЛИНИИ FetMSC С ПОМОЩЬЮ ФРАКТАЛЬНОЙ РАЗМЕРНОСТИ МИНКОВСКОГО

А. В. Ревитцер^{1,*}, В. И. Чубинский-Надеждин¹, Ю. А. Негуляев¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

**E-mail: eetytnet@gmail.com*

Фибриллярный (F-) актин относится к таким объектам клеточной биологии, для которых очевидна необходимость проведения качественной и количественной оценки их структуры. Один из возможных способов квантификации (наряду с измерением относительной интенсивности флуоресценции) — использование фрактального подхода, в рамках которого изображения структур рассматриваются как геометрические фигуры, и проводится их количественная оценка с применением фрактальной размерности Минковского (ФРМ, или box-counting алгоритм).

Ранее нами было обнаружено, что предсердный натрийуретический пептид (ПНП) способен влиять на организацию F-актина створчатых клеток линии FetMSC (Ревитцер и др., 2022). Целью данной работы являлось проведение количественной оценки состояния структур F-актина в клетках FetMSC, обработанных ПНП или латрункулином Б (Lat B), с помощью вычисления ФРМ в плагине FracLac для программного пакета ImageJ. Расчет ФРМ состоял из нескольких последовательных операций обработки флуоресцентных изображений F-актина, окрашенного родамин-фаллоидином (TRITC-Phalloidin). Во-первых, в плагине

устанавливали тип измерений – Box-counting. Далее, с помощью функции Image → Color → Split Channels, в изображении выделяли канал, содержащий F-актин. После этого, изображение переводили в черно-белый формат с помощью функции Process → Binary → Make Binary, и получали “скелет” фигуры (функция Process → Binary → Skeletonize). Затем, с использованием инструмента “свободное выделение” (Freehand selection), выделяли интересующую клетку, и далее проводили расчет значения ФРМ с помощью функции Scan. Полученные данные заносили в таблицу MS Excel, итоговые значения ФРМ представлены средними из 10 измерений ($n = 10$) и их стандартной ошибки (S.D.), достоверность различий оценивали с помощью дисперсионного анализа с уровнем значимости $p < 0.05$.

Наши расчеты показали, что значения ФРМ F-актина клеток FetMSC в контроле и после их инкубации с 1000 нМ DMSO (растворитель латрункулина Б), 10 и 1000 нМ Lat B в течение 30 мин составили, соответственно, 1.54 ± 0.06 , 1.52 ± 0.08 , 1.57 ± 0.08 и 1.40 ± 0.07 . ФРМ F-актина клеток, обработанных 1000 нМ Lat B, достоверно отличалась от контрольной, $p < 5 \times 10^{-7}$. Значения ФРМ в контроле и после инкубации клеток с 10 нМ ПНП и 1000 нМ ПНП в течение 24 ч составили, соответственно, 1.45 ± 0.49 , 1.56 ± 0.52 и 1.43 ± 0.46 . ФРМ F-актина клеток, обработанных 10 нМ ПНП, достоверно отличалась от контрольных, $p < 0.05$. Таким образом, метод расчета ФРМ показал себя адекватным подходом для выявления изменений в структурной организации F-актина при действии биологически активных веществ (латрункулина Б и ПНП).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18 15-00106).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ревитцер А.В., Чубинский-Надеждин В.И., Негуляев Ю.А. 2022. Анализ перестроек фибриллярного актина в мезенхимных стволовых клетках человека линии FetMSC с использованием фрактальной размерности Минковского. Цитология. Т. 64. № 4.

ОРГАНОИДЫ МОДЕЛИРУЮТ ЛЕГКИЕ МЫШЦЫ *IN VITRO* И СОДЕРЖАТ РАЗНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК

А. Л. Риппа^{1,*}, М. А. Борисов¹, Е. В. Киселева¹, Е. А. Воротеяк¹

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

*E-mail: rippa86@yandex.ru

Мезенхимные клетки обеспечивают поддержание целостности альвеол. Они генерируют и модифицируют внеклеточный матрикс, совместно регулируют сосудистую сеть, способствуют восстановлению эпителия, секретуют факторы для привлечения клеток иммунной системы и осуществляют трофические взаимодействия с эпителиальными клетками. Известно, что именно PDGFRB+ популяция интерстициальных фибробластов легких, а не PDGFRA+, ответственна за развитие патологических реакций и генерацию избыточного внеклеточного матрикса при фиброзе легких. Органоиды легких активно используют в качестве модели для исследования самообновления клеток, межклеточных взаимодействий и сигнальных путей, критичных для развития и регенерации легких. В нашем исследовании мы получали органоиды из тотальной фракции клеток эмбриональных легких E16.5, E18.5 и постнатальных легких мышей P1, P7, P60. Наблюдали образование крупных органоидов с полостью и органоидов меньшего размера без полости. Клетки в органоидах неонатальных легких активно пролиферируют, в эпителии экспрессируются маркеры клеток респираторного эпителия: секретоглобин и ацетилированный альфа тубулин; и альвеолярного эпителия: сурфактант С и аквапорин 5. Крупные полые органоиды, в отличие от мелких, содержат клетки, экспрессирующие маркер базальных клеток респираторного эпителия, кератин 5. Спустя месяц культивирования некоторые органоиды формируют разветвленную структуру. В составе органоидов E16.5 и E18.5 обнаружены популяции PDGFRB+, PDGFRA+ и двойная положительная PDGFRA+ PDGFRB+ популяция мезенхимных клеток. При этом, на срезах легких этих сроков развития двойная положительная популяция мезенхимных клеток обнаруживается крайне редко. Экспрессия YAP и его активация с перемещением в ядро имеет решающее значение для морфогенеза ветвления легких. ИГХ анализ экспрессии YAP в легких E18.5 и P7 показал, что в эмбриогенезе его ядерная локализация обнаруживается преимущественно в некоторых клетках эпителия бронхиол, тогда как в раннем постнатальном периоде YAP детектируется в ядрах в большом количестве клеток как в бронхиальном, так и в альвеолярном пространстве. Вдобавок, результаты анализа экспрессии *Yap1*, *Taz* и нижестоящих мишеней *Ccn1* и *Ccn2* количественным ПЦР показали выраженную активность сигналинга именно на срок P7, по сравнению с E18.5. Легкие P7 находятся на стадии активной альвеоляризации, реорганизация альвеол за счет вторичной септации приводит к механическому напряжению ткани легких, о чем дополнительно свидетельствует ядерная экспрессия YAP. В органоидах легких YAP экспрессируется в эпителиальных клетках снаружи полости органоидов и в мезенхимных клетках, находящихся в тесном контакте с эпителием. В целом данные экспрессии маркерных белков эпителиальных и мезенхимных

клеток легких, а также YAP, указывают на то, что клеточный состав и сигнальные события в органоидах легких *in vitro* близко отражают организацию легких мыши *in vivo*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-30015).

ФЕНОМЕН ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ МОЛЕКУЛ ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК В СТВОЛОВЫЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ – ОСНОВА МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ НОВОГО РАДИОПРОТЕКТОРНОГО ПРЕПАРАТА

Г. С. Риттер^{1,*}, Д. Д. Петрова², В. С. Рузанова¹

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*E-mail: dilkwe@yandex.ru

В работах (Ritter et al., 2020; Dubatolova et al., 2021) охарактеризовано радиопротекторное действие двуцепочечной РНК (дцРНК), выделенной из дрожжей *S. cerevisiae*. Были описаны эффективные параметры применения препарата дцРНК. Показано, что внутривенное введение 7 мг препарата суммарной РНК за 30 мин до облучения абсолютно летальной дозой γ -радиации в 9.4 Гр экспериментальным мышам повышает выживаемость животных до 80–100%. Обнаружено, что дцРНК способна интернализироваться в стволовые гемопоэтические клетки (СГК) и что введение мышам препарата РНК до облучения эффективно снижает выраженность костномозгового синдрома. На основании полученных результатов была сформулирована рабочая гипотеза механизма радиопротекторного действия дцРНК, согласно которой дцРНК, введенная в кровоток, интернализуется стволовыми гемопоэтическими клетками, где она принимает участие в пострadiационной репарации двуцепочечных разрывов. После репарации спасенные СГК выходят в кровоток и оседают в стволовых нишах опустошенных органов гемопоэза. Там клетки пролиферируют, инициируя восстановление гемопоэтической и иммунной системы. Вследствие форсированного восстановления системы кроветворения повышается выживаемость облученных мышей.

В настоящем исследовании были приведены твердые экспериментальные доказательства некоторых элементов рабочей гипотезы действия препарата дцРНК. Было установлено, что: 1) дцРНК, введенная внутривенно экспериментальному животному, не подвергается гидролизу и циркулирует в кровотоке как минимум в течение часа после введения; 2) дцРНК интернализуется во внутриклеточные компартменты Sca1/CD34+ примитивных костномозговых предшественников естественным природным механизмом; 3) при внутривенной инъекции дцРНК меченной радиоактивным фосфором (P^{32}) материал детектируется в основном в костном мозге; 4) мобилизованные ККМ заселяют преимущественно костный мозг и селезенку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ritter G.S. et al. 2020. Characterization of biological peculiarities of the radioprotective activity of double-stranded RNA isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Radiat. Biol. V. 96. P. 1173.

Dubatolova T.D. et al. 2021. Changes in the number and morphology of blood cells in mice pretreated with RNA preparations and exposed to the sublethal dose of gamma radiation of 8 Gy. International J. Radiation Research. In press.

ВЛИЯНИЕ ПАРА-КРЕЗОЛ СУЛЬФАТА НА МИТОХОНДРИИ CD4+ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ ВИЧ-ПОЗИТИВНЫХ БОЛЬНЫХ

Е. В. Сайдакова^{1,2,*}, Л. Б. Королевская¹, В. В. Власова¹, К. В. Шмагель¹

¹“Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук” – филиал ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

*E-mail: radimira@list.ru

Одним из наиболее значимых факторов в развитии иммунодефицита при ВИЧ-инфекции является иммунная активация. Иммуноциты, в частности CD4+ Т-клетки, активируются и погибают при ответе на бактерии и продукты их жизнедеятельности, поступающие через поврежденный кишечный барьер. После введения антиретровирусной терапии (АРТ) нагрузка на иммунную систему снижается, начинается процесс регенерации CD4+ Т-лимфоцитов. Их количество увеличивается посредством пролиферации клеток памяти. В случае, когда CD4+ Т-клетки памяти делятся непродуктивно и восстановления иммунной системы не

происходит, говорят о развитии иммунологического неответа на лечение. Причины данного феномена неизвестны.

Цель настоящего исследования: установить роль продуктов микробной жизнедеятельности в нарушении регенерации CD4+ Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных лиц, получающих АРТ.

Проанализированы образцы, полученные от субъектов 3 клинических групп: иммунологических неответчиков (ИН), пациентов со стандартным ответом на АРТ и относительно здоровых лиц. Проведен метаболический анализ плазмы крови и изолированных CD4+ Т-клеток памяти. Установлено, что содержание пара-крезол сульфата (PCS) – продукта жизнедеятельности кишечной флоры – увеличено у ИН относительно групп сравнения. Количество PCS позитивно коррелировало с концентрацией I-FABP (маркер повреждения кишечного барьера) и IL-6 (показатель воспаления), и негативно – с количеством CD4+ Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных больных. Мы предположили, что PCS может влиять непосредственно на CD4+ Т-клетки памяти и их способность делиться.

Для проверки этой гипотезы в экспериментах *in vitro* полученные от здоровых людей CD4+ Т-клетки памяти стимулировали анти-CD3/CD28 частями и культивировали 72 ч с разными концентрациями PCS (10–50 мкМ). Это привело к нескольким эффектам: дозозависимому росту доли связывающих AnnexinV клеток (увеличение склонности к апоптозу) и снижению количества лимфоцитов, давших более одной генерации (уменьшение эффективности пролиферации). Также воздействие PCS привело к изменениям митохондрий CD4+ Т-клеток памяти: снижению количества органелл и плотности крист, усилению митофагии. Следует отметить, что у ИН были выявлены аналогичные дефекты в митохондриях CD4+ Т-клеток памяти *ex vivo*: сниженный заряд мембраны; уменьшенное число крист; увеличенное число органелл, склонных к митофагии.

Таким образом, у ВИЧ-инфицированных больных продукты жизнедеятельности кишечной флоры, такие как пара-крезол сульфат, могут воздействовать на CD4+ Т-клетки памяти, изменять состояние их митохондрий, снижать пролиферативную способность лимфоцитов и регенераторный потенциал иммунной системы в целом.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 121112500044-9.

НАРУШЕНИЕ БАЛАНСА ФАКТОРОВ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА И АНГИОГЕНЕЗА В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И МИОБЛАСТАХ МОЖЕТ БЫТЬ ОДНИМ ИЗ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ФИБРОЗА ПРИ ЛИЦЕ-ЛОПАТОЧНО-ПЛЕЧЕВОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

О. О. Сербина^{1, *}, Е. В. Киселева¹, Е. С. Васецкий¹

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

**E-mail: olatyeva94@gmail.com*

У больных лице-лопаточно-плечевой мышечной дистрофией (ЛЛПМД) дегенерация мышечной ткани сопровождается фиброзом. Патологический фиброз, который по существу является процессом чрезмерного накопления компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), является конечным результатом каскада событий, происходящих от повреждения ткани через воспаление. Взаимодействие и дисбаланс различных типов клеток поддерживают выработку многочисленных факторов роста, протеолитических ферментов, ангиогенных факторов, белков ВКМ и цитокинов, которые вместе нарушают микроокружение поврежденной ткани и стимулируют отложение элементов соединительной ткани, постепенно разрушая и заменяя архитектуру ткани. Помимо ремоделирования ВКМ в поврежденной мышечной ткани происходит ангиогенез, который способствует развитию новой сосудистой сети в месте повреждения, в то время как новообразованные мышечные волокна подвергаются росту и созреванию. В скелетных мышцах присутствуют мезенхимальные стромальные клетки (МСК), которые могут участвовать в регенерации мышц и реорганизации ВКМ наряду с другими клетками. Когда мышца повреждена, МСК из других областей могут мигрировать в поврежденную область и также участвовать в процессе восстановления. Ранее мы показали, что миобласты от доноров с ЛЛПМД могут стимулировать такую миграцию МСК. Цель работы – исследовать влияние МСК на реорганизацию ВКМ и ангиогенез при моделировании ЛЛПМД *in vitro*.

Мы показали, что миобласты от пациентов с ЛЛПМД стимулируют продукцию коллагена в условиях воспаления, а также фибронектина (основных белков внеклеточного матрикса) клетками МСК. Однако на уровне экспрессии мРНК такого влияния МСК на миобласты не выявлено. Мы предположили, что на уровень белков ВКМ, синтезируемых и секретируемых МСК, может влиять дисбаланс факторов, участвующих в реорганизации ВКМ, как экспрессируемых миобластами, так и экспрессируемых МСК. Показали, что миобласты и миотубулы от больных доноров по сравнению со здоровыми донорами экспрессируют больше MMP2 в 2 раза, TIMP3 – в 3 раза. Миобласты от пациентов с ЛЛПМД стимулируют продукцию MMP МСК. МСК в

свою очередь способствуют изменению уровня экспрессии ЛЛПМД-миобластами факторов ангиогенеза (ангиопоэтин, VEGF) и ремоделирования внеклеточного матрикса (ММР, TIMP).

Таким образом, взаимодействие миобластов и МСК в очаге поражения мышц при ЛЛПМД может приводить к нарушению баланса факторов ремоделирования ВКМ и ангиогенеза, что, вероятно, является одним из звеньев развития патологического фиброза мышц при ЛЛПМД.

Работа выполнена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН № 0088-2021-0016.

ВЛИЯНИЕ ТОПОЛОГИИ ПОВЕРХНОСТИ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-Е-КАПРОЛАКТОНА НА АДГЕЗИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

П. М. Середкина^{1,2,*}, А. С. Чабина¹, А. В. Нашекин³, А. И. Лихачев³, Ю. А. Нашекина¹

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

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

³*Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: seredinapl@mail.ru*

Поли-ε-капролактон (ПКЛ) нашел широкое применение в регенеративной медицине в составе тканеинженерных конструкций. ПКЛ является частично кристаллическим полимером, при кристаллизации которого образуются анизотропные структуры – сферолиты.

Известно, что для тканевой инженерии важна биоактивность материала, которая определяется множеством факторов, однако ключевыми являются свойства поверхности, так как именно с ней прежде всего и происходит контакт клеток. Наиболее существенный вклад в биосовместимость материала вносят такие параметры, как гидрофильность, заряд поверхности, химический состав и топология поверхности.

И хотя рельеф или топология поверхности матриц оказывает влияние на биосовместимость, а значит и на адгезию клеток, для ПКЛ тема все еще остается малоизученной. Таким образом, целью данного исследования стало изучение влияния топологии поверхности на культивирование клеток.

Для получения матриц с различной топологией поверхности варьировали условия их получения, а именно – концентрацию ПКЛ в хлороформе (0.02 и 0.06 г/мл), объем раствора полимера нанесенного на единицу площади (20, 50 и 75 мкл/см²) и температуру испарения растворителя (4 и 37°C).

Структуру поверхности ПКЛ матриц анализировали в поляризованном свете с помощью микроскопа Nikon Eclipse LV1. Было выявлено, что при увеличении объема раствора ПКЛ, концентрации раствора полимера и температуры испарения растворителя размер сферолитов увеличивается. Наибольшая разница в размерах была обнаружена при варьировании температуры при испарении растворителя. Для 4°C характерны сферолиты с наименьшим диаметром, а для 37°C – с наибольшим.

Изучение влияния топологии поверхности ПКЛ матриц на адгезию мезенхимальных стромальных клеток (МСК) проводили путем окрашивания клеток генцианвиолетом на разных сроках культивирования (2, 4 и 6 ч). В качестве контроля использовали чистое стекло. Через 2 ч культивирования достоверные различия между адгезией на матрицах, полученных при различных условиях формирования, не были обнаружены. Но уже через 4 ч различия были обнаружены. Наибольший прирост в адгезии был обнаружен на матрицах, для которых характерны сферолиты меньшего диаметра.

Наиболее стабильный прирост в адгезии клетки демонстрируют на пленках, полученных при температуре 37°C. Через 6 ч культивирования именно на этих матрицах обнаружено больше всего клеток.

Таким образом, топология поверхности ПКЛ матриц оказывает влияние на адгезию МСК клеток.

КОМПОЗИТНЫЕ КОЛЛАГЕНОВЫЕ ПЛЕНКИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ

М. Ю. Сироткина^{1,*}, А. К. Зенкова², С. В. Шабельников¹, А. В. Нашекин³, Ю. А. Нашекина¹

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

²*Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия*

³*Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: m.s.778321@yandex.ru*

Одной из ведущих причин инвалидности по зрению является заболевание роговицы. Для восстановления роговицы в последние годы активно разрабатываются тканеинженерные конструкции, состоящие из клеток и полимерных материалов. Коллаген I типа – основной компонент внеклеточного матрикса роговицы и является перспективным материалом для тканеинженерных матриц. Также в нативной роговице присутствует

коллаген V типа, он образует гибридные фибриллы с коллагеном I типа. Коллаген V типа в своей молекулярной структуре имеет N-концевой фрагмент, который выступает за пределы фибрилл и ограничивает их латеральный рост. Помимо этого, коллаген V типа участвует в нуклеации фибрилл. Единообразие диаметра фибрилл необходимо для сохранения прозрачности роговицы, однако диаметр фибрилл также оказывает влияние на механические свойства матрицы и клеточный ответ.

Целью данной работы является получение коллагена I и V типа и формирование на их основе матриц для культивирования клеток роговицы.

Коллаген I типа выделяли из сухожилий крысиных хвостов методом кислой экстракции. Коллаген V типа получали из плаценты человека. Выделенный коллаген I типа характеризовали методом электрофореза, коллаген V типа характеризовали методом иммуноблоттинга. Методом ионообменной жидкостной хроматографии коллаген V типа был очищен и разделен на две фракции с присутствием и отсутствием N-концевого фрагмента. На основании полученных материалов формировали композитные матрицы в виде пленок.

Методом сканирующей электронной микроскопии и с применением инструментов программного обеспечения ImageJ исследовали диаметр фибрилл в матрицах с различным содержанием коллагена V типа с наличием и отсутствием N-концевого фрагмента. Было показано, что увеличение содержания коллагена V типа как с наличием, так и с отсутствием N-концевого фрагмента, приводит к количественному увеличению в матрице тонких фибрилл.

Также исследовали влияние свойств матриц с различным содержанием коллагена V типа на морфологию, подвижность, адгезию и пролиферацию клеток линии Statens Seruminstitut Rabbit Cornea (SIRC). Показано, что композитные матрицы с отсутствием N-концевого фрагмента у коллагена не оказывают отрицательного влияния на адгезивную и пролиферативную активность клеток. Матрицы с N-концевым фрагментом у коллагена оказывают отрицательное влияние на адгезивную и пролиферативную активность клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20120).

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПРОЦЕССОВ АНГИОГЕНЕЗА, ВОСПАЛЕНИЯ И ОРГАНИЗАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН БЕЛКАМИ ТРЕМАТОД

А. А. Тарасенко^{1,2,*}, О. Г. Запарина¹, А. В. Ковнер¹, М. Ю. Пахарукова^{1,2}, В. А. Мордвинов¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*E-mail: alena9931@mail.ru

Регенерация кожных покровов является естественным процессом, однако в некоторых случаях развиваются хронические незаживающие раны, которые представляют особую проблему для людей с диабетом, курящих и пожилых. Большое количество случаев хронических незаживающих ран и неуспешные попытки их лечения диктуют поиск новых эффективных неспецифических стимуляторов заживления ран. Ранее было показано, что экскреторно-секреторный продукт трематоды кошачьей двуустки *Opisthorchis felineus* стимулирует пролиферацию эпителия желчных протоков. Эти данные позволяют рассматривать белки трематод в качестве потенциального ранозаживляющего агента.

С целью исследования стимуляции регенерации кожи с использованием экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) и лизата трематоды *O. felineus* на модели заживления поверхностных ран у мышей линии C57BL/6J были получены препараты экскреторно-секреторного продукта и лизата взрослых особей трематод *Opisthorchis felineus*. Животным наносили поверхностную рану кожи диаметром 8 мм. Препараты ЭСП и белков лизата *O. felineus*, а также контрольные препараты (хлоргексидин и метилцеллюлоза) наносили на рану мышей в течение 7–10 дней, каждые 3–4 дня.

Анализ зарастания поверхностных ран кожи у мышей показал, что ЭСП и белки лизата *O. felineus* способствуют значимому более быстрому зарастанию ран по сравнению с контролем ($p < 0.05$). Гистологическими методами показано, что ускоренное зарастание сопровождалось значимым снижением площади воспалительной инфильтрации в ране животных.

Согласно анализу уровня экспрессии генов при обработке ран белками лизата трематоды *O. felineus* через 10 дней в ране завершаются воспалительные реакции (*Arg1*, *Ltb4r1*, *Nos2*), процессы эпителизации (*Krt19*), ангиогенеза (*Vegfa*), организации внеклеточного матрикса (*Mmp2*, *Mmp9*), поскольку уровень экспрессии мРНК генов в экспериментальной группе снижался до показателей, определяемых в здоровой коже.

В необработанной ране через 10 дней после ранения уровни экспрессии генов *Ltb4r1*, *Nos2* (воспалительные процессы), *Vegfa* (ангиогенеза), *Mmp2*, *Mmp9* (организации нового внеклеточного матрикса) были повышены, а уровень экспрессии гена *Krt19* (процессы эпителизации) был понижен по сравнению со здоровой кожей.

Таким образом, поскольку препараты, полученные на основе трематод *Opisthorchis felineus*, способствуют ускоренному заживлению поверхностных ран, по-видимому, в их составе присутствуют ростовые факторы, которые могут в дальнейшем применяться для стимуляции регенерации тканей млекопитающих.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 18-15-00098).

ПРИМЕНЕНИЕ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ ДЛЯ ЭКСПАНСИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СТРОМЫ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Л. Н. Токтохоева^{1,*}, Е. С. Дёмина¹, А. С. Долодоев², А. А. Нимаева³, М. Ф. Серых³, Р. Ю. Абашеев¹,
А. П. Цыбденова^{1,2}, Ю. С. Балханов²

¹Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова, Улан-Удэ, Россия

²ООО "МИП "Байкальский центр биотехнологий", Улан-Удэ, Россия

³ООО "Шэнэскин", Улан-Удэ, Россия

*E-mail: lyubov2316@mail.ru

В настоящем исследовании проведена оценка эффективности использования лизата тромбоцитов в качестве альтернативы эмбриональной телячьей сыворотки для экспансии мезенхимальных стволовых клеток из стромы пупочного канатика человека в клинических и лабораторных протоколах.

Применение лизата тромбоцитов в связи с поиском оптимального состава сред для культивирования клеток, не содержащих ксеногенных компонентов и предназначенных для клинических и лабораторных протоколов, представляется актуальным (Сергеева и др., 2014; Арутюнян и др., 2015). Целью работы являлось определение влияния лизата тромбоцитов на морфофизиологические особенности стволовых клеток пупочного канатика человека *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Выделение мезенхимальных стволовых клеток осуществляли из вартонова студня пупочного канатика человека ферментативным методом с помощью коллагеназы I типа. Введение первичных линий мезенхимальных стволовых клеток проводили в среде DMEM/F12 с эмбриональной телячьей сывороткой и лизатами тромбоцитов человека (из венозной и пуповинной крови). Криодеструкцию концентратов тромбоцитов осуществляли при -20°C не менее 48 ч. Размороженные и ресуспендированные образцы лизата тромбоцитов центрифугировали при 3000 об./мин в течение 15 мин и приносили в бессывороточную среду.

Результаты. Показана пролиферативная активность и дифференцировочный отклик мезенхимальных стволовых клеток пупочного канатика человека при добавлении 10% лизата тромбоцитов в среду культивирования.

Выводы. Установлено, что внесение тромболизата в специализированную питательную среду для культивирования стволовых клеток обеспечивает получение качественного клеточного трансплантата в те же сроки, что и при культивировании с эмбриональной телячьей сывороткой. Полученные данные позволяют рекомендовать использование лизата тромбоцитов в качестве альтернативы ксеногенной сыворотки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Арутюнян И.В., Макаров А.В., Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х. 2015. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки пупочного канатика: биологические свойства и клиническое применение. Гены и клетки. Т. 10. № 2. С. 30.

Сергеева Н.С., Шанский Я.Д., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А., Кувшинова Е.А., Мейснер И.С. 2014. Биологические эффекты тромбоцитарного лизата при добавлении в среду культивирования клеток человека. Гены и клетки. Т. 9. № 1. С. 77.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ, НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МИОФИБРОБЛАСТОВ В 2D- И 3D-МОДЕЛЯХ ФИБРОЗА

А. Е. Толстолужинская^{1,*}, Н. А. Басалова¹, А. Ю. Ефименко^{1,2}, Р. Ю. Еремичев¹

¹Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия

²Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия

*E-mail: a.luzh@yandex.ru

Фиброз является патологическим процессом, приводящим к разрастанию соединительной ткани, и может привести к потере архитектуры ткани и зачастую к полной дисфункции органа. Единицей фиброза яв-

ляется фибротический фокус, который представляет собой специфический внеклеточный матрикс (ВКМ), окруженный синтезирующими его миофибробластами. Миофибробласты возникают при фиброзе путем дифференцировки клеток-предшественников под действием провоспалительных факторов. На процессы дифференцировки миофибробластов также сильно влияет их микроокружение, в котором часто обнаруживают мезенхимные стромальные клетки (МСК). МСК способны участвовать в регуляции фиброза через подавление дифференцировки миофибробластов за счет своей паракринной активности, например, путем секреции внеклеточных везикул (ВВ-МСК). Ключевую роль в этом процессе могут играть микроРНК в составе ВВ-МСК. Поэтому нашей целью было изучить механизмы влияния ВВ-МСК и микроРНК в их составе на фиброгенез и дифференцировку миофибробластов.

Для достижения этой цели мы разработали 3D-модель *in vitro* на основе клеточных сфероидов, которая имитирует фибротический фокус как морфофункциональную единицу фиброза. Модель представляет собой децеллюляризированный фибротический матрикс, продуцированный фибробластами в составе сфероида, окруженный миофибробластами. Мы проанализировали влияние фракции ВВ-МСК, полученной методом ультрафильтрации кондиционированной среды МСК, на полученной нами 3D-модели фибротического фокуса.

С помощью иммуноцитохимического анализа мы обнаружили, что добавление ВВ-МСК приводит к снижению характерного маркера миофибробластов – белка α -гладкомышечного актина, а также к разрушению ВКМ в составе модели. Вероятно, это связано с влиянием ВВ-МСК на дифференцировку миофибробластов в составе модели фибротического фокуса.

Чтобы раскрыть молекулярные механизмы наблюдаемых эффектов ВВ-МСК, мы использовали 2D-модель дифференцировки миофибробластов, к которым также добавляли фракцию ВВ-МСК. Это приводило к снижению экспрессии α -актина и компонентов фибротического ВКМ в клетках, в том числе коллагена I типа. Ранее в нашей лаборатории было выявлено, что влияние ВВ-МСК на дифференцировку миофибробластов опосредовано наличием в них микроРНК. Поэтому мы решили проанализировать специфические микроРНК, связанные с фиброзом и дифференцировкой клеток, путем трансфекции ВВ-МСК синтетическими ингибиторами микроРНК. В результате было показано, что влияние ВВ-МСК на миофибробласты обусловлено, в том числе, присутствием в них микроРНК-129 и -92a.

Таким образом, используя 2D- и 3D-модели фиброза *in vitro*, мы подтвердили роль ВВ-МСК в регуляции дифференцировки миофибробластов. Мы выяснили, что микроРНК-129 и микроРНК-92a, вероятно, участвуют в реализации данного эффекта. Эти данные в дальнейшем могут быть использованы для рассмотрения ВВ-МСК и антифибротических микроРНК в качестве перспективных кандидатов для лечения фиброза.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 20–315-90120 и № 21-315-70002).

РЕГУЛЯЦИЯ *EX VIVO* ГЕМОПОЭЗА РАННИМИ ОСТЕОКОММИТИРОВАННЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭФФЕКТОВ МИКРОГРАВИТАЦИИ

Е. А. Тырина^{1, *}, Л. Б. Буравкова¹

¹Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: eagolikovamsu@gmail.com

Известно, что микрогравитация оказывает негативное влияние на гемопоэз, что может быть связано с воздействием на гемопоэтическую нишу костного мозга. В поддержании оптимального гемопоэтического микроокружения особая роль принадлежит мезенхимальным стромальным клеткам (МСК) и их потомкам (бипотентным остео-/адипо- и ранним остеогенным предшественникам, остеообластам), которые являются гравичувствительными. В связи с этим в настоящей работе в модели строма-зависимой экспансии гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток (ГСПК) исследовали влияние моделирования эффектов микрогравитации на эффективность *ex vivo* гемопоэза в присутствии МСК или их ранних остеоконмитированных предшественников.

К ранним остеоконмитированным МСК (остео-МСК) и интактным МСК (инт-МСК) добавляли суспензию мононуклеаров пуповинной крови (пкМНК) и культивировали совместно в течение 72 ч при 20% O₂. После этого неадгезированные клетки удаляли, а флаконы с адгезированными пкМНК полностью заполняли ростовой средой, насыщали CO₂ в инкубаторе и культивировали в статическом контроле и на системе случайного позиционирования (RPM) в течение 7 сут. Оценивали суспензионную и МСК-ассоциированную фракции ГСПК, иммунофенотипировали, оценивали количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в

составе ГСПК, анализировали цитокиновый профиль кондиционированной среды мультиплексным иммунофлуоресцентным методом.

После RPM выявили снижение количества ГСПК, ассоциированных с остео-МСК, по сравнению с инт-МСК. В ассоциатах с остео-МСК доля примитивных ГСПК уменьшилась из-за уменьшения вклада ранних предшественников. Также выявлено снижение доли клеток эритроидного и лимфоидного ряда в обеих группах. В ассоциатах с остео-МСК по сравнению с инт-МСК экспозиция на RPM привела к увеличению моноцитарных клеток. Количество суспензионных клеток увеличилось в обеих группах на RPM. Как в сокультурах с инт-МСК, так и с остео-МСК снизилось относительное количество эритроидных и гранулоцитарных клеток. Под действием моделированной микрогравитации произошло снижение общего количества КОЕ в обеих сокультурах, причем в случае остео-МСК этот эффект был гораздо более значимым. В группе с остео-МСК это произошло за счет унипотентных гранулоцитарных, моноцитарных и эритроидных КОЕ. После 7-суточного моделирования эффектов микрогравитации в сокультурах с остео-МСК по сравнению с инт-МСК выявили увеличение позитивных регуляторов гемопоэза: VEGF, линейно-рестриктированного IL-6 и миелосупрессивных хемокинов GRO, MCP-3.

Таким образом, ранние остеокоммитированные МСК влияют на субпопуляционную структуру миелоидных предшественников и характер ее изменений при моделировании эффектов микрогравитации. Экспозиция на RPM привела к увеличению числа коммитированных предшественников, что проявилось снижением общего количества КОЕ и могло быть опосредовано изменением профиля растворимых медиаторов, в частности, повышением содержания VEGF.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-29-04026).

БИОАКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО МАТРИКСА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

Р. Е. Ушаков^{1,*}, Н. А. Пуговкина¹, Ю. С. Иванова¹, Н. Д. Аксёнов¹, Е. В. Ломерт¹,
И. Е. Перевозников¹, Е. Б. Бурова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: uszakow@yandex.ru

Внеклеточный матрикс (ВКМ) играет исключительно важную роль у многоклеточных, контролируя клеточные функции и интегрируя клетки в единый организм. Децеллюляризованные внеклеточные матриксы (дВКМ) находят свое применение в тканевой инженерии и регенеративной медицине как материалы, обладающие высокой биосовместимостью и стимулирующие репаративные процессы. Основным источником дВКМ являются животные органы и ткани, однако в последние годы возросло внимание исследователей к дВКМ клеточных культур. Такие дВКМ обладают рядом преимуществ, основным из которых является возможность получения дВКМ желаемого состава для решения определенных биомедицинских задач. В этой связи интерес представляют мезенхимные стромальные клетки (МСК), секретирующие большое количество сигнальных молекул, в том числе и матрикс-ассоциированных.

В данной работе подбирали оптимальный протокол децеллюляризации ВКМ эндометриальных МСК человека (эМСК). Клетки культивировали в течение 14 дней в 10% ПРС с 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты. Из трех методов децеллюляризации – EDTA, Тритон X-100 и CHAPS – наиболее предпочтительным оказался лизис клеток с помощью 0.5% CHAPS + 20 мМ гидроксида аммония в течение 5 мин. Было показано, что в дВКМ эМСК отсутствуют ядра, актиновые и тубулиновые цитоскелеты и содержатся коллагены I, III и IV типов, а также фибронектин и ламинин.

Затем изучали влияние дВКМ на пролиферацию и миграцию эМСК. У эМСК доля клеток в S-фазе клеточного цикла была в 1.5 раза больше по сравнению с контролем на пластике, прирост числа клеток на дВКМ за 4 дня также оказался существенно выше ($p < 0.01$). Анализ треков движения клеток показал, что эМСК на дВКМ имеют в 2 раза большую среднюю скорость движения, и их траектории более прямолинейны, чем у эМСК на пластике ($p < 0.01$).

Далее дВКМ эМСК был опробован в качестве субстрата для культивирования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПС), полученных из эМСК. ИПС адгезировали к дВКМ эМСК и делились, формируя колонии с четко выраженной границей. ИПС, проведенные через несколько пассажей на дВКМ эМСК, демонстрировали экспрессию маркеров плюрипотентности Oct4, Sox2, Nanog, SSEA4 и TRA-1-60.

Таким образом, дВКМ эМСК, выделенный с помощью оптимизированного протокола, сохраняет свои биоактивные свойства, и он может быть использован для создания биосовместимых скаффолдов или как модель для изучения взаимодействий “матрикс-клетка”. Кроме того, дВКМ эМСК может рассматриваться как субстрат для бесфидерного культивирования ИПС.

ПОЛУЧЕНИЕ СКАФФОЛДОВ ИЗ ПРИРОДНЫХ БИОПОЛИМЕРОВ И ОЦЕНКА ИХ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

Д. А. Филиппенко^{1,*}, Н. А. Омелько¹, Н. М. Семенихина¹

¹Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

*E-mail: bio-grave@yandex.ru

Разработка скаффолдов и тканеинженерных конструкций кожи на их основе направлена на улучшение эффективности лечения долго не заживающих ран, глубоких ожогов, эпителизации больших площадей поврежденного кожного покрова при хирургических операциях (Asbill et al., 2000). Кожные эквиваленты используют в косметологии при испытании новых косметических средств, а также в фармакологии для оценки биологической активности и проницаемости лекарственных препаратов и др. (Carlson et al., 2008).

Цель работы: разработать скаффолды на основе природных биополимеров, коллагена и хитозана, и оценить их цитотоксичность на культуре клеток.

Для получения коллагена выделяли сухожилия из крысиных хвостов в количестве не менее 1 г. После измельчения заливали их 0.5 М уксусной кислотой в объеме 250 мл. Экстракцию производили на протяжении 30 дней при 4°C. Далее раствор центрифугировали при 10000 g. Для приготовления раствора хитозана брали низкомолекулярный хитозан и готовили его 1%-ный раствор в 2%-ной уксусной кислоте. В дальнейшем в чистые растворы биополимеров добавляли глутаровый альдегид или 40%-ный раствор формальдегида. После этого растворы замораживали и лиофильно высушивали при $T = -80^{\circ}\text{C}$ и давлении в 0.12 Мбар в течение 10 ч в лиофильной сушилке. Полученные губки автоклавировали. Оценка цитотоксичности проводилась согласно ГОСТу ISO-10993-2-2011 с использованием культуры дермальных фибробластов.

Результаты исследований: нами были получены 9 образцов губок с различными физическими свойствами. Так, например, хитозановые губки были более плотными, обладали большой влагоудерживающей способностью и имели пористую структуру, в отличие от коллагеновых губок, у которых преобладала волокнистая структура. Однако чистая хитозановая губка плохо восстанавливалась после деформации, в воде приобретала форму геля. При добавлении сшивающего агента влагоудерживающая способность хитозановых губок снижалась, но пористая структура сохранялась. При добавлении формальдегида такая губка становилась менее прочной и крошилась.

Анализ цитотоксичности полученных образцов биополимерных скаффолдов в виде губок показал ее отсутствие во всех образцах, кроме полученных на основе чистого хитозана без сшивающего агента либо с использованием раствора формальдегида. При этом уже на вторые сутки после культивирования клеток в среде, полученной после экстракции таких губок, при морфологическом исследовании были выявлены изменения формы фибробластов с веретеновидной на округлую с неровными контурами. Также отмечали появление клеточного дебриса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Asbill C. et al. 2000. Evaluation of a human bio-engineered skin equivalent for drug permeation studies. Pharmaceutical research. V. 17. P. 1092.

Carlson M.W. et al. 2008. Three-dimensional tissue models of normal and diseased skin. Curr. Protoc. Cell Biol. V. 41. P. 1991.

РЕГИСТРАЦИЯ АКТИВНОСТИ ОДИНОЧНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА ПРИ 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИИ

З. М. Хайруллина^{1,2,*}, А. В. Сударикова¹, М. А. Шорохова¹, В. Ю. Васильева¹,
Ю. А. Негуляев¹, В. И. Чубинский-Надеждин¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: khairyllina@mail.ru

Трехмерные (3D) клеточные агрегаты (сфероиды) физиологически более приближены к условиям, наблюдаемым *in vivo*, по сравнению с 2D-культурой клеток. Использование 3D-клеточных культур имеет хорошие перспективы в регенеративной медицине. Так, например, агрегирование мезенхимных стволовых клеток (МСК) в сфероиды повышает выживаемость трансплантированных клеток и существенно увеличивает их терапевтический потенциал при регенерации тканей. В то же время, организация стволовых клеток в 3D-культуру влияет на микроокружение клеток, а также на поляризацию, морфологию и межклеточные взаимодействия МСК.

Регуляция биологических процессов, поддерживающих важнейшие физиологические реакции МСК, таких как пролиферация, миграция, дифференцировка и т.д., тесно связана с функционированием различных типов ионных каналов. В связи с существенными изменениями свойств клеток при 3D-культивировании профиль экспрессии, роль и механизмы регуляции ионных каналов, и степень их участия в физиологических реакциях МСК могут значительно отличаться от монослойной культуры. Возникает вопрос о возможности регистрации и анализа функциональной активности ионных каналов в клеточных сфероидедах. Электрофизиологическое исследование ионных каналов в мембране клеток, агрегированных в сфероиды, сопряжено с техническими трудностями, которые возникают при применении стандартного протокола проведения опытов с помощью метода локальной фиксации потенциала (патч-кламп). В настоящей работе мы разработали и успешно применили специфический подход для успешного образования стабильного контакта между микропипеткой и плазматической мембраной МСК, формирующих сфероид. В качестве модельной клеточной линии были выбраны МСК эндометрия (эМСК) – удобный и перспективный объект для регенеративной медицины, в которых нами ранее были идентифицированы различные ионные каналы. Нами впервые была зарегистрирована активность механочувствительных (МЧ) ионных каналов в 3D-культуре и показано их функциональное взаимодействие с калиевыми каналами большой проводимости. Важно отметить, что мы наблюдали значительное снижение частоты активации МЧ каналов в сфероидедах, что может свидетельствовать об изменении уровня их функциональной экспрессии по сравнению с 2D-культурой эМСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-15-00106).

ОСТЕОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ОСТЕОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* АССОЦИИРОВАНА СО СЛАБЫМ ИЗМЕНЕНИЕМ ИХ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ

И. А. Хворова^{1,*}, Д. А. Костина¹, Б. Р. Зайнуллина², Е. А. Фефилова¹, Е. С. Громова¹, Р. М. Тихилов³, С. А. Божкова³, А. П. Середя³, В. В. Карелкин³, А. Б. Малашичева¹, А. А. Лобов¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Ресурсный центр “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: irina.khvorova99@gmail.com

Заживление переломов представляет собой сложный процесс, при котором основными источниками клеток-предшественников остеобластов становятся надкостница и эндост. Мезенхимные стволовые клетки костного мозга также участвуют в этом процессе, однако не в качестве основного источника предшественников остеобластов, а путем секреции цитокинов и хемокинов, которые способствуют остеогенной и хондрогенной дифференцировке. Тем не менее, большинство экспериментов по остеогенной дифференцировке *in vitro* было выполнено именно на модели МСК. Клеточные механизмы и сигнальные каскады, лежащие в основе дифференцировки предшественников остеобластов во взрослой кости, до сих пор недостаточно изучены. Изучение ранних механизмов дифференцировки остеобластов, выделенных из костей взрослых людей, важно для понимания молекулярных механизмов индукции остеогенной дифференцировки в зрелой кости.

Целью нашей работы стало сравнение протеомов остеобластов, выделенных из костей взрослых пациентов, при стандартном культивировании *in vitro* и на ранней стадии остеогенной дифференцировки. Для этого мы выделили первичные культуры остеобластов из фрагментов бедренной кости и индуцировали их остеогенную дифференцировку. На пятый день остеогенной дифференцировки выделяли белок и проводили протеомный анализ полученных образцов. Параллельно проводили иммуноцитохимическую окраску на основные маркеры остеогенной дифференцировки и оценивали уровень минерализации внеклеточного матрикса.

При культивировании в стандартных условиях в остеобластах выявляются маркеры поздних стадий остеогенной дифференцировки, в том числе BMP-2/4, остеокальцин, остеопонтин и RUNX2. Тем не менее, минерализация внеклеточного матрикса происходит только после индукции остеогенной дифференцировки.

Протеомный анализ выявил слабые различия между остеобластами до и после остеогенной дифференцировки. Образцы контрольных и дифференцированных клеток формируют отдельные кластеры при анализе главных компонент (PCA), но было выявлено только девять статистически значимых дифференциально экспрессирующихся белков между контрольными и дифференцируемыми остеобластами.

Таким образом, несмотря на способность к пролиферации *in vitro*, эти клетки имеют протеом, сходный со зрелыми остеобластами. По-видимому, в них уже экспрессируются все основные белки, необходимые для формирования костной ткани. Однако переход к кальцификации внеклеточного матрикса все же требует небольшого физиологического сдвига, который нам удалось детектировать при помощи протеомных методов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (проект № 20-74-10077).

ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ РОГОВИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, МЕЧЕННЫХ ЗЕЛЕНЫМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫМ БЕЛКОМ

Ю. И. Хорольская^{1, *}, Д. А. Переплетчикова¹, К. Э. Журенков¹, И. О. Гаврилюк², Э. И. Александер-Синклер¹,
Д. В. Качкин³, Н. А. Михайлова¹, М. И. Блинова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: khorolskaya@incras.ru

Заболевания роговицы занимают одно из ведущих мест в мире среди причин слепоты и слабовидения. Для большого числа патологических состояний роговицы, характеризующихся тяжелым течением болезни и не поддающихся традиционным методам лечения, существует необходимость в разработке подходов к лечению с использованием клеточных технологий, направленных на восстановление функциональности стволовых клеток роговицы. Физиологическая и репаративная регенерация эпителия и стромы роговицы осуществляется за счет клеток, локализуемых в области лимба – узкой зоны фиброзной оболочки глаза между роговицей и склерой. В базальном слое лимбального эпителия находятся стволовые клетки, ответственные за регенерацию эпителия роговицы – лимбальные эпителиальные стволовые клетки (ЛЭСК). В стромальной зоне лимба, прилегающей к базальной мембране, локализуются лимбальные стволовые клетки мезенхимного происхождения (Л-МСК). ЛЭСК и Л-МСК представляются наиболее перспективным источником клеточного материала для создания биомедицинских клеточных продуктов при лечении патологий роговицы. Однако требуются дальнейшие исследования их регенеративного потенциала и механизмов дифференцировки.

В ходе данного исследования получена и охарактеризована линия лимбальных стволовых клеток мезенхимного происхождения, стабильно экспрессирующая зеленый флуоресцентный белок EGFP – Л-МСК-EGFP, а также показана возможность их трансдифференцировки в эпителиальном направлении в условиях *in vitro*. С помощью данной генетической модификации была проведена оценка возможности миграции и выживаемости трансплантированных в составе тканеинженерной конструкции клеток на модели патологии роговицы *ex vivo*, а также на модели лимбальной недостаточности *in vivo*.

Было показано, что при трансплантации клеток линии Л-МСК-EGFP в составе коллагенового гидрогеля на модель деэпителизованной поверхности роговицы *ex vivo*, клетки интегрируются в ткань органной культуры роговицы и сохраняют жизнеспособность в процессе культивирования. В условиях *in vivo* после трансплантации на амниотической мембране человека клетки линии Л-МСК-EGFP интегрируются в ткань роговицы кролика, однако сохраняют жизнеспособность непродолжительное время. Предположительно, при заданных условиях трансплантации в ситуации острого воспаления и под воздействием вспомогательных терапевтических препаратов (местные анестетики, антибиотики и противовоспалительные средства), трансплантированные клетки линии Л-МСК-EGFP погибали, однако в ткани и на 90-е сут сохранялись постклеточные структуры, содержащие белок EGFP.

Полученные результаты представляют практическую значимость для исследований в области офтальмологии при разработке биомедицинских клеточных продуктов. Проведенное исследование позволило лучше понять процессы, происходящие в ходе трансплантации тканеинженерных конструкций на поверхность роговицы модельных животных, а полученная линия клеток Л-МСК-EGFP может стать удобным инструментом для исследований в области регенеративной офтальмологии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-773).

СОЗДАНИЕ КОМПОЗИТНЫХ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭФИРОВ ДЛЯ ЗАДАЧ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

А. С. Чабина^{1,*}, А. В. Нашекин², А. И. Лихачев², Д. А. Курдюков², Н. Д. Просалов², Ю. А. Нашекина¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: chabina-alina@yandex.ru

Такие полиэфиры, как поли-l-лактид (ПЛЛА), поли-d,l-лактид (ПДЛА) и поли-ε-капролактон (ПКЛ), имеют долгую историю использования в тканевой инженерии, особенно в качестве матриц для трансплантации клеток. Однако эти материалы гидрофобны, не имеют поверхностного заряда, и в них отсутствуют сайты связывания, что ослабляет адгезию клеток, а значит и лимитирует применение этих полимеров в составе тканеинженерных конструкций. Поэтому были разработаны различные методики по увеличению биосовместимости полиэфира для нужд регенеративной медицины.

Одной из таких методик является введение активных функциональных групп путем физического смешивания, т.е. создание композитных матриц. Перспективным считается создание таких матриц на основе смеси полиэфира с полиэтиленгликолем (ПЭГ) или полиэтиленгликольдиамином (ПЭГ-2NH₂), главным образом ввиду их гидрофильности, а также из-за возможности получения матриц с различной топологией путем растворения фазы ПЭГ и ПЭГ-2NH₂. Таким образом, целью нашей работы стало создание функциональных композитных матриц на базе полиэфира для задач тканевой инженерии.

Композитные матрицы получали из смеси двух полимеров в следующем массовом соотношении – 70% полиэфира и 30% ПЭГ или ПЭГ-2NH₂. Для растворения фазы ПЭГ и ПЭГ-2NH₂ композитные матрицы инкубировали в воде в течение суток.

Количество вышедшего из композитных матриц ПЭГ и ПЭГ-2NH₂ после инкубирования определяли спектрофотометрическим методом. Было выявлено, что ПЭГ-2NH₂ вымывается из матриц не полностью (50–60%), а при выходе ПЭГ происходит и частичное вымывание основного полимера.

Поверхностную структуру матриц изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Было обнаружено, что фаза ПЭГ и ПЭГ-2NH₂ после растворения формирует на полиэфире лунки или поры разного диаметра. Это было подтверждено конфокальной микроскопией за счет качественной оценки распределения ПЭГ-2NH₂ на полиэфирных матрицах с помощью химически пришитой флуоресцентной метки FITC.

Влияние модификации на гидрофильность матриц изучали методом сидячей капли. Было выявлено, что краевой угол смачивания уменьшается после введения ПЭГ и ПЭГ-2NH₂.

На полученных матрицах изучали адгезию и пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в течение 2 ч, 4 ч, 1 сут и 3 сут после посева. Было выявлено, что по сравнению с немодифицированными матрицами адгезия и пролиферация МСК увеличилась, особенно для матриц с ПЭГ-2NH₂.

Морфологию МСК после культивирования на композитных матрицах в течение 1 сут изучали с помощью конфокальной микроскопии. Среди композитных матриц наилучшие результаты были выявлены для клеток на матрицах с ПЭГ-2NH₂. На них клетки имеют физиологическую фибробластоподобную форму, хорошо распластаны и четко просматриваются актиновые филаменты.

Таким образом, создание композитных матриц улучшает характеристики полиэфира для задач тканевой инженерии.

КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПОЛНОСЛОЙНОГО КОЖНОГО ЛОСКУТА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССА РЕГЕНЕРАЦИИ

О. Л. Черкашина^{1,*}, Е. И. Моргун¹, А. Л. Риппа¹, А. В. Косых¹, Э. С. Черных¹,
Е. П. Калабушева¹, Е. А. Воротеяк¹

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

*E-mail: olgalcher@gmail.com

Изучение кожи человека *in vivo* осложняется рядом этических факторов, а *in vitro*-модели не воспроизводят все сложные аспекты взаимодействия между кожными компартментами. Модели ксенотрансплантации фрагментов кожи позволяют изучать в живом организме процессы, происходящие в человеческой ткани. Мы разработали уникальную модель ксенотрансплантации полнослойного кожного лоскута, содержащего эпидермис, дерму, жировую ткань, а также волосяные фолликулы (ВФ), сальные и потовые железы челове-

ка, мышам с иммунодефицитом, которая позволяет поддерживать жизнеспособность ткани и изучать происходящие в ней процессы в течение длительного срока.

Фрагменты кожи человека трансплантировали мышам линии NOD/SCID. Биоптаты изучали иммуногистохимически на 40, 75 и 110 сут после трансплантации и сравнивали с фрагментами интактной кожи. При помощи программ ImageJ и Cell Profiler анализировали морфометрические параметры, изучали распределение и содержание маркеров. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8.

В дерме наибольшие отличия от нормы наблюдаются на 40 сут после трансплантации: обнаруживается воспалительный инфильтрат, отсутствует стратификация, увеличивается содержание FAP, PDGFR α , CD90, CD26 и виментина. К 75–110 сут большинство показателей приходит в норму, появляется папиллярная дерма, и ее толщина уменьшается до нормального уровня, остается увеличенным только содержание CD26. Анализ адипоцитов показал, что изменение их размеров соотносится с изменением стадии цикла ВФ: на 75–110 сут ВФ находятся в среднем анагене, а размер адипоцитов вокруг ВФ уменьшается. Эти данные указывают на постепенное завершение регенеративных процессов.

Эпидермис на 40 сут утолщен, его толщина снижается к 110 сут, но все еще превышает нормальный уровень. Кератин 10, маркер супрабазальных слоев, не обнаруживается в нижних 2–3 слоях эпидермиса на всех сроках, в то время как в норме он появляется начиная со 2 слоя. Параллельно с этим меняется распределение YAP1 – транскрипционного коактиватора, роль которого в коже заключается в регуляции процессов дифференцировки и пролиферации. В норме он активно экспрессируется в базальном слое и имеет ядерную локализацию в единичных клетках. На 40 сут YAP1 выявляется в том числе в ядрах супрабазальных слоев, а к 75–110 сут обнаруживается в большинстве ядер базального слоя. Данные, полученные при исследовании биопсий кожных патологий (хронической раны при остеомиелите и кожной папилломы), позволяют предположить, что такие изменения могут быть связаны именно с активацией YAP1.

В разработанном нами ксенотрансплантате часть процессов, преимущественно в дерме, к 110 сут приходит в норму, но в эпидермисе все еще наблюдаются серьезные изменения. Несмотря на некоторые отличия, модель успешно воспроизводит строение кожи и позволяет преодолеть ограничения других моделей для изучения процессов регенерации кожных структур.

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

РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ РЕЗИДЕНТНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКИХ

И. В. Чистякова^{1,*}, Н. И. Бакаленко¹, А. Б. Малашичева¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: itjerena7@gmail.com

Легочный фиброз представляет собой гетерогенную группу патологических состояний, характеризующихся необратимым ремоделированием легочной интерстициальной ткани фиброзной (рубцовой), что сопровождается нарушением дыхательной функции. Центральную роль в формировании фиброза играют массовые скопления миофибробластов в паренхиме, а также избыточное отложение внеклеточного матрикса, включая коллаген I типа. Происхождение фибробластов при фиброзе легких является предметом многочисленных исследований. Считается, что одним из потенциальных источников миофибробластов, являются эпителиальные клетки, которые путем эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) приобретают фибробластный фенотип. Известно, что некоторые сигнальные пути, в частности сигнальный путь Notch, обуславливающий прохождение клетками физиологически необходимого ЭМП, в определенных условиях, например, при циклически повторяющихся повреждениях эпителиальных клеток, претерпевают aberrantную активацию и приводят к развитию фиброза. У млекопитающих описано 4 типа рецептора NOTCH (NICD1–4). В ряде исследований было показано, что NICD1 и NICD3 участвуют в дифференцировке миофибробластов в легких человека и мыши.

Цель исследования – оценить влияние активации 4-х рецепторов Notch (NICD1–4) на фибробласты легких человека.

В работе использованы фибробласты легких человека, полученные в результате торакотомии. Для получения первичной легочной культуры использовали среду Basal Human Lung Fibroblast medium с добавлением коктейля ростовых факторов, 2 mM L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицин. Независимую от лиганда активацию Notch проводили с помощью лентивирусной экспрессии внутриклеточного домена каждого рецептора Notch (NICD1–4). После трансдукции клетки культивировались в течение 8 дней. После этого оценивали экспрессию маркеров ЭМП (SNAIL), миофибробластов (α -SMA) и эпителиальных легочных клеток (LAMP3, SP-C, PDPN, HOPX) с помощью ПЦР в реальном времени и иммуногистохимического окрашивания.

Мы обнаружили, что активация Notch-сигналинга (NICD1, NICD2, NICD3, NICD4) приводит к активации экспрессии SNAIL и α -SMA. Наиболее выраженный эффект наблюдался в клетках, зараженных лентивирусной конструкцией с NICD4. При этом экспрессия α -SMA и SNAIL сопряжена с полной потерей клетками характерных эпителиальных альвеолярных маркеров.

Таким образом, активация Notch, по-видимому, способствует дифференцировке резидентных фибробластов в миофибробласты, являющиеся ключевым фактором в развитии легочного фиброза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1075).

РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПОСЛЕ АМПУТАЦИИ ЗАДНИХ СЕГМЕНТОВ У ЮВЕНИЛЬНЫХ *ALITTA VIRENS*

А. Ю. Шалаева^{1,*}, В. В. Козин¹

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

*E-mail: shalaeva.sasha@gmail.com

Нервная система (НС) у аннелид обладает функциями, способствующими ее глубокой интеграции в восстановительный процесс. Несмотря на яркие экспериментальные доказательства необходимости НС для регенерации аннелид, конкретные механизмы ее влияния остаются загадкой. НС может выступать как источником молекул, регулирующих регенерацию, так и вспомогательным элементом для миграции других клеточных типов. Отдельный интерес представляют процессы, происходящие в самой НС во время восстановления утраченной части тела.

Для установления пролиферативной активности в пределах брюшной нервной цепочки (БНЦ) мы провели эксперименты по включению EdU при инкубации до и после операции, с последующими отмывками на протяжении до трех дней, а также изучили распределение EdU-позитивных ядер в интактных животных на уровне потенциальной ампутации. У интактных животных мы наблюдали активное включение EdU в пределах БНЦ. С увеличением продолжительности отмывки мы наблюдали размытие метки, что является индикатором активных клеточных делений. Об этом свидетельствует также расположение меченых ядер группами на одном оптическом уровне конфокального среза. При инкубации до операции на сроке 1 день после ампутации (дпа) мы наблюдали активное включение EdU в поврежденном и примыкающем спереди неповрежденном ганглии. К стадиям 2 и 3 дпа число ядер с EdU увеличивается, были отмечены ядра с разной интенсивностью метки. При инкубации сразу после операции на 1 дпа в единичных случаях были отмечены EdU-позитивные ядра в глубине БНЦ, хотя в большинстве случаев сигнала в нервной системе не наблюдали. К 2 дпа группы меченых ядер появляются в стенках БНЦ, как в ганглии сегмента, прилежащего к ране, так и в ганглии следующего сегмента. Это свидетельствует о незамедлительной реакции тканей НС на повреждение и значительном снижении активности пролиферации ее клеток, которые, по-видимому, не вносят вклад в материал регенерационной почки.

В будущем для углубления понимания роли БНЦ в регенеративных процессах было бы интересно изучить профиль ее транскрипционной активности на разных стадиях регенерации. Эти данные позволят нам изучить дифференциально экспрессирующиеся гены, регулирующие регенеративный ответ. Для этого были проведены эксперименты по вырезанию брюшной нервной цепочки на различных стадиях регенерации с последующим выделением РНК и ее секвенированием.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-74-00055).

СЕКЦИЯ “МОЛЕКУЛЯРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ПРОТИСТОЛОГИЯ”

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА НЕКОТОРЫХ ТРИХОСТОМАТИД (CILIOPHORA: LITOSTOMATEA)

М. Е. Белоконь^{1,*}, Л. В. Чистякова²

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

²ЗИН РАН, Лаборатория паразитических червей и протистов, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: mirrobella@mail.ru

Trichostomata — это крупный подкласс эндобионтных инфузорий, обитающих в ЖКТ различных млекопитающих. Недавно было показано, что для изучения морфологии трихостоматид может быть успешно использован метод иммунофлуоресцентной микроскопии. Использование меченных флуорохромами антител к α -тубулину позволяет не только выявлять особенности организации цилиатуры, но и визуализировать об-

ший план строения микротрубочкового цитоскелета эндобионтных инфузорий. В нашей работе впервые были исследованы особенности организации цилиатуры *Ditoxum funinucleum* Gassovsky, 1919 (Entodiniomorphida, Spirodiniidae) и *Blepharocorys microcorys* Gassovsky, 1919 (Entodiniomorphida, Blepharocorythidae) – инфузорий, обитающих в кишечнике различных представителей рода *Equus*. Инфузории были выделены из проб фекалий зебр *Equus quagga* (собраны в 2019 г. в Южно-Африканском заповеднике Naval Hill Franklin Nature Reserve (Фри-Стейт, ЮАР), а также лошадей *Equus ferus caballus* (собраны в 2021 г. в частной конюшне на территории населенного пункта Большое Кайдалово, Всеволожский район, Ленинградская область).

В результате проведенного нами иммунофлуоресцентного окрашивания в составе ротовой цилиатуры *D. funinucleum* выявляются две ресничные зоны – вентральная и дорзальная. Вентральная зона образует практически прямую линию, дорзальная формирует дугу. По общему плану организации ротовой цилиатуры *D. funinucleum* сходен с представителями родов *Tetratoxum* и *Spirodinium* (Wolska, 1980, 1985). Кроме того, на поверхности исследованных инфузорий хорошо заметны передняя дорзальная и задняя вентральная соматические ресничные дуги. От соматических ресничных дуг отходят тяжи из α -тубулина, или немадесмы. В некоторых случаях выявляются также параллельно лежащие пучки микротрубочек между адоральной зоной и передней дорзальной ресничной дугой. Развитая система немадесм в связи с соматическими ресничными дугами была ранее обнаружена у других представителей семейства Spirodiniidae – *Spirodinium equi* и *Cochliatoxum periaetum* (Kornilova et al., 2022). Сходство в организации тубулинового цитоскелета может свидетельствовать о филогенетической близости этих таксонов. С другой стороны, мощное развитие немадесм может быть связано с необходимостью формирования дополнительных элементов цитоскелета при увеличении размеров инфузорий.

В клетках *B. microcorys* выявляются три ресничные зоны в составе оральная цилиатуры, а также две соматических ресничных зоны – фронтальная и каудальная. Кроме того, хорошо заметны т.н. специальные кинетосомы – группа укороченных ресничек на переднем конце клетки. Общий план строения цилиатуры *B. microcorys* соответствует таковому блефарокоритид (Wolska, 1971). Однако данный вид четко отличается от других представителей рода *Blepharocorys*, прежде всего, по особенностям организации ротовой цилиатуры.

Работа выполнена в рамках госзадания № 1021051402849–1 (Зоологический институт РАН).

ИНВАЗИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *SERRATIA* ПРИВОДИТ К НАКОПЛЕНИЮ Е-КАДГЕРИНА В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Ю. М. Берсон^{1,*}, О. А. Цаплина¹, Е. С. Божокина¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: juletschka.ber@gmail.com

В последнее время среди грамотрицательных энтеробактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций – все чаще обнаруживаются бактерии рода *Serratia*. Известно, что условно-патогенные бактерии *Serratia proteamaculans* и *Serratia grimesii* способны к инвазии – проникновению в нефагоцитирующие эукариотические клетки (Tsaplina et al., 2009; Bozhokina et al., 2011). Для проникновения бактерии используют рецепторы клетки хозяина.

Имеются данные, что бактериальные белки или небелковые продукты могут влиять на экспрессию рецепторов в эукариотических клетках. Так, обработка клеток М-HeLa N-ацетилцистеином приводила к увеличению экспрессии гена Е-кадгерина в клетках карциномы шейки матки человека М-HeLa, а предварительная инкубация клеток М-HeLa с N-ацетилцистеином способствовала увеличению инвазии *S. grimesii* в эпителиальные клетки (Bozhokina et al., 2013). Увеличение экспрессии гена Е-кадгерина и усиление инвазии бактерий *S. grimesii* в клетки аденокарциномы ободочной кишки человека Сасо-2 наблюдалось при обработке клеток Сасо-2 мембранными везикулами, продуцируемыми *S. grimesii* (Божокина, Берсон, 2021).

Целью данной работы было выявление влияния инвазии бактерий *S. grimesii* и *S. proteamaculans* на экспрессию Е-кадгерина в эукариотических клетках Сасо-2 и М-HeLa. Накопление Е-кадгерина в эпителиальных клетках оценивали методом Вестерн-блоттинга.

В ответ на заражение бактериями *S. grimesii* и *S. proteamaculans* в клетках Сасо-2 происходило более чем 2-кратное увеличение накопления полноразмерного Е-кадгерина по сравнению с контролем. В клетках М-HeLa экспрессия Е-кадгерина мала, и индикация белка методом Вестерн-блоттинга невозможна. Однако после заражения исследуемыми бактериями также было обнаружено накопление Е-кадгерина, но белок присутствовал лишь в расщепленном виде. В ходе экспериментов были обнаружены фрагменты молекулярной массой около 105, 60 и 40 kDa, что соответствует результатам протеолиза Е-кадгерина (Schmidt et al., 2016).

Расщепление Е-кадгерина может быть обусловлено как действием бактериальных протеаз, так и опосредованно бактериальными токсинами. В *S. proteamaculans* был обнаружен порообразующий токсин ShlA (Tsaplina et al., 2015). Для ShlA, продуцируемого *Serratia marcescens*, известен механизм опосредованного расщепления Е-кадгерина, при котором токсин формирует поры в эукариотической мембране, что способствует притоку

в клетку ионов Ca^{2+} , которые, в свою очередь, активируют эукариотическую шеддазу ADAM10 (Huber et al., 2020). Нами было обнаружено, что заражение *S. grimesii* приводит к большему накоплению ионов Ca^{2+} в клетках М-HeLa, чем при заражении *S. proteamaculans*, что говорит о наличии у *S. grimesii* дополнительных факторов, вызывающих накопление ионов Ca^{2+} .

Таким образом, заражение эпителиальных клеток М-HeLa и Сасо-2 бактериями *S. grimesii* и *S. proteamaculans* приводит к увеличению количества Е-кадгерина в эукариотических клетках, а также его протеолизу.

SUCTORIA – НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА СИСТЕМУ ПОДКЛАССА И ДОПОЛНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЕГО ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ

Н. А. Бородин^{1,*}, М. Е. Белоконов¹, В. Р. Хабибулина¹, М. С. Мелехин^{1,2}

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

³Зоологический институт Российской академии наук, Лаборатория клеточной и молекулярной протистологии, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: nikitik25@gmail.com

Suctoria – подкласс инфузорий, отличительной чертой представителей которого является отсутствие ресничек на протяжении большей части жизненного цикла. Сосущие инфузории, как правило, ведут прикрепленный образ жизни, а субстратом для прикрепления могут выступать как водные беспозвоночные животные, водоросли и водная растительность, так и объекты неживой природы. Молекулярно-филогенетические исследования представителей подкласса практически не проводились: количество доступных в базах данных последовательностей маркерных генов несравнимо мало по сравнению с другими таксонами инфузорий подобного ранга. Кроме того, большинство видовых описаний было выполнено исключительно с опорой на морфологические признаки. Поэтому целью нашей работы стало исследование биоразнообразия щупальцевых инфузорий с использованием как микроскопических, так и молекулярно-генетических методов.

Материал для нашей работы был собран как в акватории Баренцева, Белого и Черного морей, так и в пресноводных водоемах Санкт-Петербурга и Ленинградской области. В ходе исследований были обнаружены представители как минимум 7 описанных ранее родов *Suctoria*. Для ряда исследуемых инфузорий помимо качественных прижизненных оптических изображений были впервые получены снимки с использованием сканирующего и трансмиссионного электронных микроскопов. В дополнение к прижизненным наблюдениям был применен классический диагностический метод окраски ядерного аппарата по Фельгену. Нами были получены последовательности маркерного гена 18S рРНК исследуемых инфузорий, а также проведен молекулярно-филогенетический анализ, позволивший предположить наличие потенциально новых видов в составе исследуемых родов, а также определить положение таксонов, описанных ранее исключительно с помощью микроскопических методов. Молекулярно-филогенетический анализ с использованием имеющихся в базах данных последовательностей генов 18S рРНК представителей подкласса Suctoria, а также полученных нами данных, показал несоответствие принятой ранее системы группы щупальцевых инфузорий, базирующейся на основе типов почкования, филогенетической структуре подкласса. Таким образом, дальнейшие исследования разнообразия этой группы представляют особый интерес для определения филогенетических взаимоотношений отрядов, столь сильно отличающихся друг от друга морфологически.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРОБНЫХ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ С QUORUM SENSING РЕГУЛЯЦИЕЙ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Е. Н. Вагнер^{1,*}, Д. Е. Сидорова², В. А. Плюта², И. А. Хмель²

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

²Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: katevagner2000@mail.ru

В природе различные популяции микроорганизмов способны выделять летучие органические соединения (ЛОС). ЛОС имеют относительно небольшую молекулярную массу (<300 Да), низкую температуру кипения и высокую липофильность. Эти свойства позволяют ЛОС распространяться на большие расстояния по воздуху и диффундировать через воду и почву. Известно, что ЛОС могут выступать как сигналы дистанционной коммуникации (“infochemicals”) и индуцировать системную резистентность у растений, а также действовать на Quorum Sensing (QS) систему регуляции бактерий, в том числе они могут осуществлять Quo-

rum Quenching (QQ). QS является одним из ключевых факторов, влияющих на образование биопленок бактерий, их вирулентность и ряд других клеточных процессов.

Целью данной работы является исследование влияния индивидуальных ЛОС на QS системы регуляции (LuxI/LuxR, LasI/LasR и RhII/RhlR) грамотрицательных бактерий, использующих N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ) в качестве сигнальных молекул.

В опытах использовали специфические *lux*-биосенсорные штаммы *Escherichia coli* JLD271/ pAL101 (RhII/RhlR), JLD271/pAL105 (LasI/LasR) и DH5 α /pSB401 (LuxI/LuxR). Все три штамма осуществляют биолюминесценцию только в присутствии экзогенных АГЛ. Также были отобраны неспецифические *lux*-биосенсоры *E. coli* JLD271/pAL102 и JLD271/pAL106 несущие гибридные плазмиды *rhlI::luxCDABE* и *lasI::luxCDABE* соответственно, с инактивированными генами, кодирующими рецепторные белки LuxR типа, и *lux*-биосенсор *E. coli* MG1655/pXen7 с конститутивным синтезом *lux* генов.

Исследуемыми ЛОС являлись 2-бутанон, 2-пентанон, 2-октанон, β -ионон, 2-фенилэтанол, изоамиловый спирт, (–)-лимонен и (+)- α -пинен с >96% чистотой. Были подобраны количества ЛОС, бактерицидное воздействие которых на клетки *lux*-биосенсорных штаммов незначительно.

По полученным нами данным, изоамиловый спирт подавляет непосредственно процесс QS регуляции систем RhII/RhlR, LasI/LasR и LuxI/LuxR, но не нарушает биолюминесценцию у неспецифических *lux*-биосенсоров. 2-Бутанон не оказывает влияния на QS системы LuxI/LuxR и LasI/LasR, но воздействует на системы RhII/RhlR и на неспецифический штамм *E. coli* JLD271/pAL102, усиливая их биолюминесценцию на 40% относительно контроля без ЛОС. 2-Пентанон и β -ионон вызывают QQ эффект только у системы LuxI/LuxR, не подавляя процесс биолюминесценции у pXen7 *lux*-биосенсора. Для (+)-альфа-пинена и (–)-лимонена наблюдался процесс QQ у систем LasI/LasR и LuxI/LuxR. 2-Октанон и 2-фенилэтанол одинаково сильно подавляли биолюминесценцию всех *lux*-биосенсоров.

Таким образом, было показано, что исследуемые ЛОС подавляют функционирование трех QS систем регуляции бактерий или демонстрируют специфичное влияние на одну из QS систем. При этом ЛОС могут влиять как на QS системы регуляции, так и непосредственно на процесс биолюминесценции, не связанный с самой QS системой регуляции бактерий.

Работа частично финансировалась Фондом в рамках государственного задания НИЦ “Курчатовский институт” – ИМГ на 2021–2022 гг. (№ 121030200227-6).

СЛОН В КОМНАТЕ: ВАЖНЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИИ ЦЕНТРОХЕЛИДНЫХ СОЛНЕЧНИКОВ, НА КОТОРЫЕ МЫ НЕ ОБРАЩАЛИ ВНИМАНИЯ

В. В. Златогурский*

Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: v.zlatogursky@spbu.ru

Центрохелидные солнечники (Centroplasthelida, Febvre-Chevalier & Febvre, 1984) известны исследователям с 1863 г., когда военный хирург Хенри Картер впервые описал *Acanthocystis turfacea*. Эти гетеротрофные, лишенные жгутиков аксоподиальные протисты всегда оставались на периферии внимания исследователей. И, действительно, не всегда легко обосновать важность исследований этой группы. Среди центрохелид известны только свободноживущие формы. Их жизненный цикл состоит из череды простых бинарных делений. За более чем полтора века исследований было описано чуть более сотни видов, в основном отличающихся по мелким деталям скелетных элементов – кремниевых или органических внеклеточных чешуек. Однако, более пристальное внимание к представителям этой группы с использованием как современных, так и вполне классических методов в последние годы позволило выявить весьма интересные и неожиданные аспекты морфологии, образа жизни и экологии представителей этой группы. Прежде всего следует отметить описание большого числа новых видов, родов и семейств, некоторые из которых настолько своеобразны, что остается лишь удивляться, как многие годы они ускользали от внимания исследователей. Так, в покровах *Raphidiophrys heterophryoides* сочетаются кремниевые и органические чешуйки, а *Yogsothoth* spp. формируют уникальные колонии с двумя типами скелета – “частным” и “общим” для всех клеток колонии. Также был открыт феномен сложных жизненных циклов у центрохелид, в ходе которых сменяют друг друга стадии, радикально отличающиеся морфологией скелета, способностью формировать колонии и размерами клеток. Генотипирование совершенно не схожих друг с другом форм, показывает, что они принадлежат к одному виду. Эта черта центрохелид также присутствует у их ближайших родственников – гаптофит, близость с которыми также открыта совсем недавно благодаря филогеномике. Также, на основе первых молекулярных данных было установлено, что один из самых массовых компонентов морского нанопланктона – представители рода *Meringosphaera* это тоже центрохелидные солнечники, хотя до этого их считали водорослями. И, наконец, самые последние метабаркодинговые исследования показывают, что наибольшее разнообразие

центрохелидных солнечников выявлено в почве, в то время как на морфологическом уровне из этого биотопа пока описан лишь один вид. Таким образом, мы лишь начинаем осознавать истинное значение центрохелидных солнечников в биосфере, по поводу них одно за другим следуют значимые открытия и, несомненно, многие из них еще впереди.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-04-00928) и РНФ (проект № 20-74-10068).

ПОИСК ФАКТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ *PROROCENTRUM CORDATUM*

В. О. Калинина^{1, *}, М. А. Бердиева¹, С. О. Скарлато¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: verakamakalinina@gmail.com

Динофлагелляты, за исключением *Noctiluca*, обладают гаплофазным жизненным циклом с зиготической редукцией, тем не менее, имеются данные о возможном митотическом делении зигот. Недавно нами был описан жизненный цикл динофлагеллят *Prorocentrum cordatum*. В стареющей культуре (растущей без добавления свежей среды более 1 месяца) наблюдали слияния гамет. Образовавшиеся зиготы затем претерпевали два синхронных мейотических деления или делились асинхронно. Однако факторы, индуцирующие переход от вегетативной фазы жизненного цикла к половой, выявлены не были. Согласно литературным данным, одним из таких триггеров у динофлагеллят является дефицит биогенных элементов, таких как азот и/или фосфор.

Клетки *P. cordatum* клон ССАР1136/16 культивировали в среде f/2 в условиях дефицита нитрата и/или фосфата в течение 21 дня. Пробы брали каждые три дня, измеряли концентрацию нитрата и фосфата и анализировали относительное содержание ДНК в клетках. После трех недель эксперимента к культурам добавляли “полную” среду со стандартным содержанием нитрата и фосфата и отбирали пробы для анализа относительного содержания ДНК через 12 ч, 1, 3 и 5 дней.

Было показано, что дефицит фосфора ведет к увеличению доли клеток с относительным количеством ДНК 2С, которая достигала 60% от общего числа клеток через две недели культивирования (в контроле их доля не превышала 20%). Кроме этого, появилась фракция клеток с относительным содержанием ДНК 4С. Эти данные могли бы свидетельствовать о том, что отсутствие фосфора в среде ведет к переходу к половому процессу в жизненном цикле *P. cordatum*. Однако клетки с относительным содержанием ДНК 4С могут быть как зиготами перед первым делением мейоза, так и диплоидными особями в фазе G₂/М. Количественная цитометрия изображений с помощью системы CQ1 (Yokogawa) не выявила увеличения количества сливающихся гамет в образцах по сравнению с контролем. Таким образом, можно предположить, что в клетках *P. cordatum* ССАР1136/16 происходит эндоредупликация. После добавления среды, содержащей фосфат, резко возрастала доля клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла. Количество клеток с относительным содержанием ДНК 4С сначала возрастало, затем постепенно уменьшалось. Через 5 дней доля клеток с относительным содержанием ДНК 2С возвращалась к исходным значениям (около 10%), а клетки с относительным содержанием ДНК 4С не выявлялись.

Дефицит нитрата и одновременный дефицит нитрата и фосфата не приводил к подобному эффекту.

На данном этапе исследования нельзя однозначно сказать является ли кратное увеличение содержания ДНК в клетках, культивируемых в среде с дефицитом фосфата, следствием полового процесса или это результат эндомитоза. Для того, чтобы это выяснить, требуются дальнейшие исследования. Однако уже сейчас можно предположить, что дефицит фосфора ведет к сдвигу в жизненном цикле динофлагеллят *P. cordatum*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00056) на базе Института цитологии РАН.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ДАННЫЕ ПОМОГАЮТ РАЗРЕШИТЬ КОНФЛИКТ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФИЛОГЕНИЙ? СЛУЧАЙ *MORELLOSPORA SACCAMOEBAE* KSL8 И *CHYTRIDIOPSIS TYPOGRAPHI*

О. Г. Камышачкая^{1, *}, Е. С. Насонова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: oksana.kamyshatskaya@gmail.com

Особый интерес в вопросе изучения происхождения и эволюции канонических микроспоридий представляют исследования организмов, объединяемых в группу “Cryptomycota” (Rozellomycota, Rozellosporidia) — многочисленную, но малоизученную группу облигатных паразитов, основное разнообразие которых пред-

ставлено последовательностями генов рРНК, полученными из метагеномных данных. Лишь некоторые из них – представители родов *Rozella*, *Nucleophaga*, *Mitosporidium*, *Paramicrosporidium* и *Morellospora* – изучены на организменном уровне и имеют таксономические описания.

На сегодняшний день существуют два основных конфликтующих варианта филогении этой группы. В первом варианте ветвь *Chytridiopsis typographyi* (единственного представителя Chytridiopsida, для которого имеются молекулярно-генетические данные), оказывается базальной по отношению к каноническим микро-споридиям и мечниковеллидам, таким образом, являясь кандидатом на место их ближайшего родственника. Во втором варианте *Chytridiopsis* оказывается в кладе X (LKM15), к которой из вышеописанных криптомикот также относятся *Mitosporidium* и *Morellospora*.

Сравнительные ультраструктурные исследования различных стадий жизненного цикла этих организмов также демонстрируют противоречивые результаты.

Одним из важнейших результатов этих исследований стало обнаружение нами митохондрио-подобных органелл у *Morellospora saccamoebae*, *Nucleophaga amoebae*, *Nucleophaga terricola* и *Paramicrosporidium saccamoebae*. Они схожи с теми, что описаны также у *Mitosporidium daphniae* и более всего напоминают митохондрии трофических стадий *Rozella*: органеллы, ограниченные двойной мембраной, с диффузным электронно-плотным матриксом и редкими кристами. Однако никаких подобных органелл на опубликованных электронограммах представителей Chytridiopsida не выявлено, что может свидетельствовать в пользу их ближайшего родства с микроспоридиями. Большую ясность в этом вопросе могут внести данные о наличии или отсутствии митохондриального генома у представителей Chytridiopsida, однако таких данных пока нет.

Другие ультраструктурные данные свидетельствуют в пользу близкого родства хитридиописид с представителями клады X и, в частности, с *Morellospora*. Так, в пользу этой гипотезы свидетельствует наличие у последней специфической обкладки короткой трубки – манубриума в виде сотового слоя, описанное ранее только для представителей Chytridiopsida. Однако ряд общих для них черт – наличие толстой короткой полярной трубки (манубриума), особенности строения зоны контакта последнего с полярным саком, спорогония путем эндогенной вакуоляризации – характерны также и для мечниковеллид (наиболее близкой к каноническим микроспоридиям группе).

Таким образом, полученные ультраструктурные данные добавляют аргументов в пользу гипотезы о близком родстве хитридиописид с представителями клады X (LKM15). Однако, для окончательного разрешения конфликта филогений необходимы более подробные ультраструктурные и геномные исследования этих организмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-74-20136) с использованием оборудования РЦ “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ АМЕБ СЕМЕЙСТВА АМОЕВИДАЕ (TUBULINEA, АМОЕВОЗОА)

О. Г. Камышацкая^{1, 2, *}, А. В. Смирнов²

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: oksana.kamyshatskaya@gmail.com

Представители семейства Amoebidae (Tubulinea, Amoebozoa) – это крупные (от 100 мкм и более) “протеусные” амёбы, имеющие преимущественно политактическую локомоторную форму с широкими и гладкими псевдоподиями. Они являются одними из самых известных и хорошо изученных голых лобозных амёб. Среди них, например, *Amoeba proteus* и *Chaos carolinense*, которые ассоциируются с понятием “классической” амёбы среди широкой аудитории. Вместе с тем, парадоксальным образом эта группа амёб остается очень сильно недоисследованной. Несмотря на большие размеры представителей семейства Amoebidae, идентификация видов среди них часто затруднена и основывается на свето-микроскопических признаках, данных о размерах и деталях их ультраструктуры. Дополнительной проблемой при изучении этих амёб является сложность культивирования отдельных видов.

Объем доступных молекулярных данных для представителей семейства Amoebidae ограничен последовательностями только пяти видов, при этом по-прежнему неизученными на молекулярном уровне остаются представители трех из шести родов этих амёб. Новые, получаемые сейчас данные приводят к существенному пересмотру взглядов на состав данного семейства.

Адаптированная нами методика извлечения одиночных ядер из клетки и применение последующих методов single-cell геномики позволили включить в исследование не только амёб, культивируемых в лабораторных условиях, но и сложно культивируемых амёб (для которых выделение единичных клеток возможно лишь из смешанных культур). Результатом этой работы стала наиболее масштабная (в сравнении с предыду-

шими работами) попытка реконструкции молекулярной филогении семейства Amoebidae. Наши данные наравне с морфологическими данными показывают, что род *Deuteroamoeba* является независимым родом семейства Amoebidae. Он надежно группируется с родами *Chaos* и *Amoeba*. Полностью поддержанным является и семейство Amoebidae в целом. Наши исследования показали, что амёбы рода *Polychaos* группируются с амёбами семейства Hartmannellidae, а не Amoebidae. Таким образом, одно из самых классических семейств амёб — семейство Amoebidae является парафилетическим таксоном и требует ревизии. Полученные данные говорят о том, что таксономические критерии для этого семейства амёб требуют серьезного пересмотра. Главной задачей на данный момент остается поиск новых таксономических признаков, которые можно использовать в качестве синапоморфных для классификации этих организмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-14-00195 с использованием оборудования РЦ “Развитие молекулярных и клеточных технологий” и “Культивирование микроорганизмов” Научного парка СПбГУ.

ПЕРЕОПИСАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ ЭНДОСИМБИОТИЧЕСКОЙ БАКТЕРИИ *PSEUDOLYDICUM MULTIFLAGELLATUM* ИЗ ЦИТОПЛАЗМЫ ИНFUЗОРИЙ РОДА *PARAMECIUM*.

Е. С. Курсачёва^{1,2,*}, А. В. Коротаев^{1,3}, Н. А. Лебедева¹, Е. В. Сабанеева¹

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

²Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Университет Базеля, Биоцентр, Базель, Швейцария

*E-mail: katrusa-sun@ya.ru

Инфузории часто образуют стабильные симбиотические системы с прокариотами. Исследование таких систем представляет интерес с точки зрения эволюции, экологии и клеточной биологии. Многие ранее сделанные описания симбионтов инфузорий были выполнены на основе исключительно морфологических данных, что затрудняет определение их филогенетического положения. Примерами таких эндосимбионтов являются граммотрицательные бактерии *Pseudolyticum multiflagellatum* из цитоплазмы инфузорий *Paramecium caudatum* (Босс и др., 1987) и *Pseudolyticum minutus* из цитоплазмы эвригалинных инфузорий *Paramecium nephridiatum*, ошибочно определенных ранее как *Paramecium woodruffi* (Фокин, 1989). Характерной особенностью обоих видов являлось наличие крупной светопреломляющей гранулы. Оба вида эндосимбионтов, сходные морфологически, но существенно различавшиеся по своим размерам, несли многочисленные жгутики, но оставались неподвижны в цитоплазме хозяина, будучи заключенными в симбионтофорные вакуоли. Групповая принадлежность этих бактерий осталась не установлена.

В цитоплазме трех клонов парамеций различного географического происхождения (о. Средний, респ. Карелия; Ст. Петергоф, г. Санкт-Петербург; г. Владимир) нами были обнаружены симбионты, морфологически сходные, по данным световой и электронной микроскопии, с описанными ранее симбиотическими бактериями *Pseudolyticum multiflagellatum* и *Pseudolyticum minutus*. Было проведено определение вида инфузорий-хозяев по двум генетическим маркерам — последовательности генов 18S рНК и первой субъединицы митохондриальной цитохром оксидазы С. Клон VL18-4 (56.106928, 40.428814) был определен как *P. caudatum*, тогда как клоны BMS16-3 (66.282500, 33.709444) и TRF-1 (59.894074, 29.879725) были отнесены к виду *P. nephridiatum*. Эндосимбионты клона VL18-4 были длиннее бактерий из клонов BMS16-3 и TRF-1 (3.3–6.6 мкм против 2.6–4.5 мкм) при одинаковой ширине в 1.1–1.7 мкм, а также могли формировать цепочки и нити при повышении температуры культивирования. Анализ последовательностей генов 16S рНК эндосимбионтов показал, что во всех трех клонах инфузорий присутствует один и тот же вид бактерий, что было подтверждено путем флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с вновь синтезированным видоспецифичным олигонуклеотидным зондом Psltyt1088. Филогенетический анализ выявил, что эндосимбионты с высокой степенью разрешения формируют монофилетичную кладу с представителями семейства “*Ca. Midichloriaceae*” порядка *Rickettsiales*. Полученные молекулярные данные дают основания для объединения видов *Pseudolyticum multiflagellatum* и *Pseudolyticum minutus* в один вид: *Pseudolyticum multiflagellatum*. Показано, что светопреломляющая гранула имеет белковую природу.

Работа выполнена с использованием оборудования и материалов Ресурсных центров СПбГУ “Культивирование микроорганизмов”, “Микроскопии и микроанализа”, “Развитие молекулярных и клеточных технологий”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Босс А.О.-Л., Борхсениус О.Н., Осинов Д.В. 1987. *Pseudolyticum multiflagellatum* — новый вид симбиотической бактерии инфузории *Paramecium caudatum*. Цитология. Т. 29. № 1. С. 94.

Фокин С.И. 1989. Бактериальные эндобионты инфузории *Paramecium woodruffi*. III. Эндобионты цитоплазмы. Цитология. Т. 31. № 8. С. 964.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОБИОМА ЖЕЛЧИ, ВЫЗВАННЫХ ИНФЕКЦИЕЙ ТРЕМАТОДАМИ *OPISTHORCHIS FELINEUS*, *OPISTHORCHIS VIVERRINI* И *CLONORCHIS SINENSIS*

Е. А. Лишай^{1,2,*}, О. Запарина², В. А. Мордвинов², М. Ю. Пахарукова^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

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

Трематоды *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* являются паразитами гепатобилиарной системы млекопитающих, включая человека. Эти три вида обладают разным канцерогенным потенциалом: *O. viverrini* и *C. sinensis* отнесены к 1А группе биологических канцерогенов, тогда как *O. felineus* – к группе 3А. Изменения микробиомных сообществ желчи, вызванные инфекцией, могут обуславливать различную канцерогенность трематод.

Цель работы: исследовать изменение микробиома фекалий и желчи хомячков при заражении трематодами *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis*, а также описать микробиом самих трематод.

Золотистые хомячки из SPF-вивария (свободного от специфических патогенов) были заражены метацеркариями, собранными в различных эндемичных регионах Азии: Таиланд (*O. viverrini*), Корея (*C. sinensis*), Россия (*O. felineus*). Из образцов фекалий и желчи хомячков, а также из взрослых особей трех видов червей была выделена ДНК. Затем были получены ДНК-библиотеки на V3–V4 регион гена 16S рибосомальной РНК. Полученные библиотеки были секвенированы на платформе MiSeq Illumina методом парных прочтений (2X300 п.о.). Обработку данных производили с использованием пакетов программ QIIME2 и R (metagenomeSeq).

В результате 18 млн прочтений были отнесены к 17 625 оперативным таксономическим единицам (OTU) и, в свою очередь, к 261 роду бактерий. Было показано, что трематоды обладают собственным микробиомом, включающим в том числе бактерии, характерные для сточных вод, пресных и морских водоемов, почвы и активного ила. Было найдено 114 уникальных для червей видов бактерий.

Анализ филогенетического разнообразия бактериальных сообществ желчи показал увеличение числа таксонов при инфекции на 200 видов. Среди них 90 видов бактерий присутствуют также в микробиоме червей, и по-видимому, переносятся от них к хозяину (патогены *Burkholderia* spp., оппортунистические патогены *Haemophilus* spp.). Остальные найденные 110 видов бактерий, вероятно, свидетельствуют о вторичных бактериальных инфекциях (*Parvimonas* spp., *Serratia* spp.).

Наибольшее изменение микробиома в желчи наблюдали при инфекции *O. viverrini* ($p < 0.05$ для 19 из 4133 OTUs). Среди найденных бактерий – вызывающие оппортунистические инфекции *Roseomonas mucosa*, *Chryseobacterium* spp., *Acinetobacter* spp. и др.

Таким образом, показано, что микробиом желчи хозяина при инфекции трематодами значительно изменяется. При этом наибольшие изменения характерны для инфекции трематодами с более высоким канцерогенным потенциалом.

Работа поддержана РФФИ и правительством Новосибирской области (№ 22-24-20010).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВНУТРИЯДЕРНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО СИМБИОНТА ИНФУЗОРИИ *PARAMESCIUM NEPHRIDIATUM*

М. С. Максимова^{1,*}, Е. С. Курсачёва^{1,2}, К. А. Бенкен¹, Е. В. Сабанеева¹

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

²Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: st078860@student.spbu.ru

Инфузории из рода *Paramecium* распространены почти повсеместно, что в сочетании с их способом питания делает этих одноклеточных эукариот удобной нишей для многих симбиотических бактерий, а также удачным объектом для изучения симбиотических систем. Среди обилия бактериальных эндосимбионтов парамеций наиболее изученными являются представители семейства Holosporaceae. К этой группе относятся известные еще с конца XIX века внутриядерные бактерии рода *Holospora*, а также близкие к ним филогенетически и сходные с ними по морфологии и жизненному циклу недавно описанные *Holospora*-подобные бактерии (HLB). Клоны парамеций БМС 9-1 и БМС 8а-1 были получены из проб, взятых в 2021 г. в лито-

ральной ванне острова Средний губы Чупа (Белое море, 66.282500, 33.709444). По морфологическим критериям данные клоны были предварительно отнесены к виду *Paramecium nephridiatum*. Проведенный нами анализ последовательности гена первой субъединицы цитохромоксидазы (COXI) подтвердил принадлежность инфузорий к этому виду. Прижизненные наблюдения с использованием световой микроскопии в режиме контраста Номарского выявили гиперинфекцию макронуклеусов инфузорий крупными палочковидными бактериями, морфологически сходными с представителями семейства Holosporaceae. При разрушении клетки парамеции ядро не теряло своей целостности, выходя во внешнюю среду в виде “клубка”. Угнетенное состояние культуры и присутствие в ней сравнительно мелких инфузорий и нерасходящихся “двойных” клеток позволили нам заключить, что симбионт нарушает деление хозяина, чем действительно характеризуются некоторые НЛВ. Исследование симбионтов с помощью атомно-силового микроскопа выявило отсутствие жгутиков, свойственное для НЛВ, и отсутствие уплощенного инфекционного кончика (infectious tip), характерного для инфекционных форм холоспор. Исследование особенностей ультратонкого строения хозяина и эндосимбионта проводится с применением трансмиссионной электронной микроскопии. Для определения групповой принадлежности эндосимбионта проведена флуоресцентная гибридизация *in situ* с использованием олигонуклеотидного зонда, специфичного участку гена 16S рРНК семейства Holosporaceae. Анализ препаратов с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии продемонстрировал положительный сигнал средней интенсивности. Секвенирование нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК и последующий поиск соответствий в системе BLAST установили принадлежность внутриядерных симбионтов к виду *Gortzia yakutica* (сем. Holosporaceae), недавно описанному у инфузории *P. putrinum*. Данная симбиотическая система является перспективной моделью для исследования лектин-гликоконъюгатных взаимодействий между хозяином и эндосимбионтом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-24-00335) с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ: “Центр микроскопии и микроанализа” и “Культивирование микроорганизмов”.

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ КИСЛЫХ ИСТОЧНИКОВ О. КУНАШИР

А. В. Малыгина^{1,*}, Е. Ю. Полякова¹, А. С. Балкин^{1,2}, С. Ю. Стефанов³, А. А. Потехин^{1,4}, Н. Е. Гоголева^{1,2,5}

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

²Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

³Государственный природный заповедник “Курильский”, п. г. т. Южнокурильск, Россия

⁴Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁵Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

*E-mail: sasha-2801@yandex.ru

Микробные биопленки распространены в различных средах обитания, в том числе экстремальных, например с высокими температурами и низким рН. Ряд источников на о. Кунашир имеет кислый рН за счет поглощения вулканических газов: CO₂, SO₂, H₂S и HCl. Для ученых по всему миру сообщества экстремальных ниш представляют значительный интерес, так как тесная взаимосвязь уникальных биохимических процессов между различными микроорганизмами биопленки может служить источником для новых биотехнологических процессов.

Были проанализированы биопленки из источников, имевших начало в районе сольфаторного поля вулканов Головнина и Менделеева. Состав источников не был исследован. По данным литературы они могли быть двух типов: кислые Cl–SO₄ и кислые SO₄. В кальдере Головнина средний рН 2.0, минерализация составляет 0.5–6 г/л. Для Cl–SO₄ вод характерно высокое содержание Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, Fe, Al³⁺. Целью работы было проведение таксономического профилирования биопленок, отобранных в источниках вулканического происхождения о. Кунашир. Анализ проводили на основе данных о регионе V3-V4 гена 16S рРНК. Для биоинформатической обработки данных использовали пакет DADA2 и MicrobiomeAnalyst.

В результате анализа сообществ биопленок было установлено, что преобладающей филой в образцах из кальдеры вулкана Головнина (биопленки 7-1 и 7-2) являлась ф. Proteobacteria (67%). Наиболее представленной группой являлись аэробные ацидофильные бактерии (оптимум рН 2.5–5.9) р. *Acidiphilium* (21%), использующие соединения серы как донор электронов, а FeIII как акцептор. Также значимыми по представленности родами являлись: род хемолитотрофных бактерий *Sulfurimonas* (15%) из филы Campylobacterota, род аэробных факультативных хемолитоавтотрофов *Thiomonas* (13%) рН 3.0–6.0, и р. *Halothiobacillus* (11%) с облигатно

хемолитоавтотрофными видами с оптимумом pH 2.5–3.0 при обитании на средах с восстановленными соединениями серы. В биопленке кальдеры вулкана Менделеева большинство бактерий относились к филумам Cyanobacteria (57%) и Proteobacteria (35%). Род сероокисляющих бактерий *Sulfuriferula*, представители которого способны расти автотрофно на неорганических соединениях серы и гетеротрофно на ряде органических субстратов, в отличие от биопленок кальдеры вулкана Головнина, составлял значительную долю таксономического разнообразия (17%).

В результате анализа было найдено 23 филы бактерий, среди которых преобладали Proteobacteria (50%), Cyanobacteria (30%) и Campylobacterota (11%). Многие представители сообществ биопленок являются ацидофилами и используют соединения серы в метаболизме. При анализе альфа-разнообразия самыми богатыми по числу ASV, индексам Chao1 и Шеннона являются биопленки кальдеры вулкана Головнина. Анализ бета-разнообразия на основе индекса Брея–Кертиса сгруппировал каждый тип биопленки в отдельный кластер.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030). Биоинформатическая часть работы была выполнена в рамках госзадания ФИЦ КазНЦ РАН.

ПРОБЛЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВ ТЕКАМЕБИД (АМОЕВОЗОА; DISCOSEA; THECAMOEVIDA) НА МОРФОЛОГИЧЕСКОМ И МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЯХ

Е. С. Мезенцев^{1,*}, Н. С. Кулишкин¹, А. А. Суркова¹, А. В. Смирнов¹

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

*E-mail: e.mezentsev@spbu.ru

Отряд Thecamoebida объединяет амёб стриадного, ругозного и языковидного морфотипов, обладающих упругими клеточными покровами. Молекулярные данные для многих представителей этого семейства отсутствуют, а их получение осложняется отсутствием типовых культур. Особенно остро эта проблема стоит для центрального рода *Thecamoeba*, в котором последовательности гена 18s рРНК были известны лишь для трех видов из девяти. До недавнего времени считалось, что в пределах этого рода амёб виды можно надежно идентифицировать по морфологическим признакам, таким как размеры локомоторной формы, наличие и расположение гребней и складок на поверхности тела амёбы, строение и размер клеточного ядра.

Наши недавние исследования показали, что в пределах отряда Thecamoebida существуют группы видов, которые трудно или невозможно различить на морфологическом уровне. Первым примером такого рода был вид *T. aesculea*, который имеет лишь незначительные отличия от *T. sphaeronucleolus*. В результате наших исследований были обнаружены еще четыре пары видов-двойников (“sibling species”) для самых широко распространенных видов родов *Thecamoeba* и *Stenamoeba*. Виды в этих парах практически не различимы на морфологическом уровне, и только молекулярные данные позволяют надежно их дифференцировать. Эти результаты показывают, что разнообразие амёб отряда Thecamoebida в природе в разы превышает известные 20 видов, а под маской одного морфологического вида могут скрываться несколько видов-двойников, обладающих весьма тонкими морфологическими отличиями. На данный момент все обнаруженные виды-двойники образуют монофилетические ветви на филогенетических деревьях, что позволяет выделить морфологические группы и, в случае сомнений, определять изученный изолят не как таксономический вид, а как амёбу, относящуюся к видовой группе (например, “*Thecamoeba striata* species group”).

Предложение идентифицировать и разделять отдельные виды на основе молекулярных данных ставит вопрос о стабильности такого рода маркеров, поскольку для большинства голых лобозных амёб половой процесс не описан, а, значит, в популяциях практически нет обмена генетической информацией между особями, отчего одиночные мутации накапливаются и приводят к неминуемо нарастающей генетической дивергенции. Однако исследования изолированных молекулярно-идентичных штаммов видов *T. quadrilineata*, *T. foliovenanda*, *T. striata* и *T. aesculea* из сильно удаленных географических точек и разных по составу проб показывают стабильность сиквенсов генов SSU и Cox I этих широко распространенных видов текамеб.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-14-00195) с использованием оборудования РЦ “Развитие молекулярных и клеточных технологий” и “Культивирование микроорганизмов” Научного парка СПбГУ.

ВНУТРИВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЯДЕР *THECAMOEBA ASTROLOGA* (АМОЕВОЗОА; DISCOSEA; THECAMOBIDA)

Е. С. Мезенцев^{1, *}, А. В. Смирнов¹

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

*E-mail: e.mezentsev@spbu.ru

Организация ядра – удобный признак для свето-микроскопической идентификации морфологических видов амёб рода *Thecamoeba*. До недавнего времени считалось, что морфологические особенности ядра, такие как форма, размерный диапазон и паттерн организации внутриядерных структур, одинаковы для большинства клеток в культурах и стабильны в течение длительного периода времени.

Недавно описанный нами вид *T. astrologa*, в отличие от других видов рода *Thecamoeba*, демонстрирует большое разнообразие паттернов организации ядра. В свежей культуре возрастом 2–3 нед. большинство клеток имеют ядра с расположенными по периферии ядрышками сложной, звездчатой формы. В более старых культурах (4 нед. и более) преобладает вариант организации ядрышкового материала в виде сложноорганизованной неоднородной периферической сети. Позже, когда культура начинает вымирать (6 нед. и более), у большинства амёб можно обнаружить многочисленные сферические ядрышки разного размера, независимо расположенные в кариоплазме. Помимо этих трех “типичных” вариантов, у этого вида амёб нами были описаны и другие паттерны организации ядрышкового материала.

“Типичный” цикл изменений в организации ядра у амёб *T. astrologa* наблюдали в культурах на wMY агаре, растущих при +16°C в условиях низкой освещенности, в чашках Петри, герметизированных парафильмом (Parafilm M). Когда клетки переносили в свежую среду, этот цикл повторялся. Разнообразные “нетипичные” варианты чаще всего наблюдали в чашках, оставленных на 1–5 дней в комнатных условиях (около 25°C, нерегулируемый свет). Такие чашки не были герметизированы и быстро теряли влагу. Около половины клеток в таких чашках сохранили “типичные” варианты организации ядра, оставшиеся же демонстрировали иные паттерны организации ядрышкового материала. Ситуация, когда картина организации ядрышкового материала резко меняется в зависимости от возраста культуры или условий культивирования, необычна и ранее не была описана. Эти изменения касаются не отдельной клетки, а большинства клеток в культуре. Следовательно, это, скорее всего, не связано с клеточным циклом или пре- или постмитотической трансформацией ядра, а связано с внешними факторами и физиологическим состоянием клетки.

Описанные выше наблюдения еще больше затрудняют морфологическую идентификацию амёб рода *Thecamoeba* и описание новых видов на морфологическом уровне. В этих условиях молекулярные методы становятся практически единственным надежным средством для идентификации и различения видов текамеб.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 20-14-00195) с использованием оборудования РЦ “Развитие молекулярных и клеточных технологий” и “Культивирование микроорганизмов” Научного парка СПбГУ.

ОЦЕНКА ЛАКТАТОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* И *GLUCONOBACTER OXYDANS*

А. Д. Мутин^{1, *}, Е. Б. Индосова¹, А. Е. Саранчина¹, П. Б. Дроздова¹, Е. В. Борвинская¹

¹Научно-исследовательский институт биологии Иркутского государственного университета, Иркутск, Россия

*E-mail: andreimutin97@gmail.com

D-лактат – это распространенный метаболит, выделяемый микроорганизмами. При нарушении нативного баланса микрофлоры D-лактат может накапливаться и проникать в кровь. Именно поэтому в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности востребованы методы определения уровня D-лактата в сложных биологических смесях. Наиболее простыми в применении по-прежнему остаются методы, которые используют ферменты, селективно распознающие энантиомеры лактата. Ранее сообщалось, что у ряда организмов есть ферменты, выполняющие функции селективных D-лактат оксидаз (Sheng et. al., 2016), которые, в перспективе, могут быть использованы для создания высокочувствительных сенсоров для обнаружения данного метаболита. Известно, что оксидазы окисляют лактат с образованием перекиси водорода в качестве побочного продукта, который может быть легко обнаружен с помощью различных калориметрических реакций. В связи с этим целью данного исследования являлось получение потенциальных D-лактат оксидаз из *Saccharomyces cerevisiae* и *Gluconobacter oxydans*, а также оценка их способности метаболизировать D-лактат, по аналогии с уже известными специфичными L-лактатоксидазами, используемыми для детекции L-лактата.

В ходе данного исследования были получены генетически модифицированные штаммы бактерий BL21(DE3)pLysS *Escherichia coli* с генами предполагаемой D-лактатоксидазы из *S. cerevisiae* и *G. oxydans*. Для трансформации бактерий использовали плазмидную конструкцию pET20b-SC-LOX и pET20b-GO-LOX с генами интереса SC-LOX и GO-LOX из *S. cerevisiae* и *G. oxydans* соответственно. Также были подобраны оптимальные условия индукции трансформированных бактерий *E. coli*, при которых количество белка в растворимой фракции было максимальным. Изучаемые гены несли последовательность из шести остатков гистидина для дальнейшей очистки белка с помощью аффинной хроматографии. В итоге были получены фракции очищенных рекомбинантных белков SC-LOX и GO-LOX.

Способность ферментов группы d-LOXs утилизировать кислород в присутствии D-лактата была показана Sheng et. al. с помощью электрода Кларка, а также реакцией окисления МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) в присутствии D-лактата (Sheng et. al., 2016). В нашей работе удалось воспроизвести субстрат-специфичную реакцию образования формазана из МТТ, однако классические calorimetricкие реакции обнаружения перекиси водорода (с гваяколом и 4-аминоантипирином в качестве хромофенов) не подтвердили наличие оксидазной активности у фермента. Полученные данные подтвердили субстратную специфичность рекомбинантных белков по отношению к D-лактату, однако фермент, описанный Sheng с коллегами, по-видимому, не является оксидазой.

Исследование проведено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-64-47011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Sheng B., Xu J., Ge Y., Zhang S., Wang D., Gao C., Ma C., Xu P. 2016. Enzymatic resolution by a d-lactate oxidase catalyzed reaction for (S)-2-hydroxycarboxylic acids. ChemCatChem. V. 8. P. 2630.

ГЕМОКСИГЕНАЗА HO-1/HSP32 ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ *PROROCENTRUM CORDATUM*: ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ОТВЕТ НА СОЛЕННОСТНЫЙ СТРЕСС

С. А. Печковская^{1,*}, Н. А. Князев¹, Н. А. Филатова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: sapechkovskaya@gmail.com

Потенциально токсичный миксотрофный вид динофлагеллят *Prorocentrum cordatum* (синоним *P. minimum*) широко распространен в морях по всему миру, в том числе и в олигогалинном Балтийском море, где в последние годы формирует вредоносные цветения. Тем не менее, биохимические и физиологические процессы, обеспечивающие успешное выживание этих микроводорослей в зоне пониженной солености, до сих пор изучены недостаточно. Изменение уровня солености окружающей среды, как известно, приводит к осмотическому стрессу в клетке, с которым позволяют справиться белки-цитопротекторы. Одним из таких белков является гемоксигеназа-1 (HO-1/HSP32), играющая важную роль в защите клетки от стресса, в том числе соленостного. Гемоксигеназа – консервативный белок, присутствующий у представителей различных таксономических групп. Особенности функционирования и регуляция активности HO-1 у динофлагеллят практически не изучены. В настоящей работе было исследовано влияние соленостного стресса на выживаемость, клеточный цикл, синтез белка HO-1 в клетках *P. cordatum* в условиях фотопериодичности, а также проведен его филогенетический анализ на основе транскриптомных данных. Филогенетический анализ гомологичных последовательностей семейства HO позволил оценить их эволюционное родство с организмами других таксонов. В результате анализа были выявлены предположительные гомологи белков HO-1 и HO-2, сформировавшие две четко выраженные группы, различающиеся аминокислотными заменами внутри консервативных последовательностей. Анализ параметров клеточного цикла в условиях фотопериодичности показал, что днем 95.9% клеток находятся в G0/G1-фазе и только 1.7% – в S-фазе. Ночью количество клеток в S-фазе увеличивается до 12.6% за счет сокращения до 83.1% в фазе G0/G1. Для экспериментальных целей клетки, растущие при солености 17‰ (контроль), переводили в условия пониженной солености 8‰. Измерение уровня синтеза белка HO-1 в контрольных условиях показало, что в дневное время количество клеток *P. cordatum*, экспрессирующих этот белок на свету, было в 2.1 раза выше, чем ночью при одинаковой средней интенсивности флюоресценции клеток (1.7 ед.). После того, как клетки динофлагеллят подвергли соленостному стрессу (8‰), количество клеток, экспрессирующих HO-1, в дневное время достоверно не изменилось, в то время как в ночных культурах увеличилось в 2.6 раза, при этом интенсивность флюоресценции также возросла с 1.7 до 2.0 ед. Полученные результаты показывают, что значительное увеличение синтеза белка HO-1 у динофлагеллят может служить биомаркером влияния стрессовых факторов окружающей среды, таких, как изменение солености. Это позволяет предположить, что изучаемый параметр демонстрирует высокий потенциал для будущего моделирования вспышек цветения водорослей, особенно вызванных потенциально токсичными видами-вселенцами в условиях пониженной солености Балтийского моря.

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ СТОЛБОВСКИХ ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКОВ О. КУНАШИР

Е. Ю. Полякова^{1,*}, А. В. Малыгина¹, А. С. Балкин^{1,2}, С. Ю. Стефанов³, А. А. Потехин^{1,4}, Н. Е. Гоголева^{1,2,5}

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

²Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

³ФГБУ Государственный природный заповедник «Курильский», п. г. т. Южнокурильск, Россия

⁴Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁵Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

*E-mail: polyakova.e.yu@gmail.com

Для жизни при высоких температурах микроорганизмам необходимы различные приспособления, в том числе термостабильные ферменты, представляющие ценность для биотехнологии. До сих пор в результате исследований микробного состава биопленок горячих источников, в том числе Курильских островов, находят прежде неизвестные таксоны таких бактерий, которые могут стать источником новых метаболитов и термостабильных ферментов.

Целью этого исследования стало изучение бактериального таксономического состава биопленок Столбовских горячих источников о. Кунашир. Были проанализированы 6 биопленок. Биопленка № 1 была отобрана в источнике при температуре 80°C, имела белесый цвет и волосяную структуру; биопленки № 2, № 4 и № 5 образовывали плотную структуру при температуре порядка 50–70°C; биопленка № 3 имела зелено-коричневый цвет и была обнаружена при температуре 67°C; биопленка № 6 представляла собой черную плотную массу, покрытую пузырями. Анализ проводили на основе данных о регионе V3-V4 гена 16S рРНК. Биоинформатическую обработку данных проводили с использованием пакета DADA2 и MicrobiomeAnalyst.

В биопленке № 1 доминантом являлись представители рода *Sulfurihydrogenibium* из филы Aquificota (64%) – хемолитоавтотрофные бактерии, окисляющие соединения серы и водород. Представители ф. Hydrothermae (17%), термофильные гетеротрофы р. *Thermus* (8%) и р. *Thermoflexus* (5%) – субдоминанты этого сообщества. В биопленке № 2 филы Chloroflexi (48%) занимает доминирующее положение, преобладают роды *Roseiflexus* и *Chloroflexus*. Далее идут представители филы Armatimonadota (11%) и Bacteroidota (7%). В биопленке № 3 преобладает фила Cyanobacteria (67%); вторые по численности – нитчатые автотрофные хемолито/органотрофные бактерии р. *Thiothrix* (28%). Биопленки № 4 и № 5 схожи по таксономическому составу с биопленкой № 2: доминанты сообщества – представители филы Chloroflexi; субдоминантные таксоны частично совпадали, однако их процентное соотношение различно. Так же, как и в биопленке № 3, в биопленке № 6 доминировала фила Cyanobacteria (79%). *Tychonema*_CCAP_1459_11B являлась превалирующей цианобактерией (57%), заметную долю занимал р. *Thiothrix* (7%).

В результате анализа было найдено 27 фил бактерий, среди которых Chloroflexi (23%), Cyanobacteria (28%), Aquificota (13%), Proteobacteria (10%) и Bacteroidota (6%) составляют 80% сообщества. Самыми богатыми сообществами по числу ASV и индексу Chao1 являются биопленки № 3 и № 6, а самые высокие значения индекса Шеннона показали биопленки № 2 и № 4. Анализ бета-разнообразия с использованием индекса Брея – Кертиса сгруппировал исследованные образцы в 3 кластера: биопленка № 1 с доминированием р. *Sulfurihydrogenibium*; биопленки № 2, № 4 и № 5 с преобладающей ф. Chloroflexi; биопленки № 3 и № 6 с преобладанием ф. Cyanobacteria.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030). Биоинформатическая часть работы была выполнена в рамках госзадания ФИЦ КазНЦ РАН.

СВОЙСТВА БЕЛКОВ, ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕЛЕНИИ *UREAPLASMA PARVUM*

Н. А. Румянцева^{1,*}, Д. Г. Бельнская¹, Д. М. Голофеева¹, И. Е. Вишняков^{1,2}, А. Д. Ведякин¹

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

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: rumyanatasha@yandex.ru

Уреаплазмы принадлежат к классу Mollicutes и являются распространенными и клинически значимыми патогенами. Лечение инфекций, вызванных уреаплазмами и другими видами микоплазм, затруднено из-за отсутствия у данных бактерий клеточной стенки, что исключает возможность применения соответствующих антибиотиков. Перспективной мишенью для новых антибактериальных препаратов считается FtsZ – основ-

ной белок деления для большинства бактерий. Однако у уреоплазм он отсутствует, также как и белки подвижности, которые, как предполагают, отвечают за деление у некоторых видов микоплазм. Таким образом, механизмы деления уреоплазм являются неизвестными. Существует несколько гипотез: деление может происходить за счет избыточного синтеза мембраны, как это происходит у бактерий в L-форме; также возможно формирование дивисомы без белка FtsZ. Известно, что у уреоплазм присутствуют гомологи белков, ответственных за сегрегацию ДНК (FtsK, SMC), которые тесно связаны с процессом деления. Также в процессе деления могут участвовать белки, формирующие цитоскелет-подобные структуры, например, продукты генов *UPA3_RS02030* и *UPA3_RS01765*.

В ходе работы исследованы свойства белка SMC *Ureaplasma parvum* в условиях *in vitro*. Полученные данные говорят о том, что он является ДНК-связывающим белком, при этом связывание с двунитовой молекулой ДНК происходит неспецифично. Также было установлено, что SMC проявляет АТФазную активность, которая незначительна в отсутствии ДНК и резко возрастает при наличии ДНК. Для подтверждения полученных результатов *in vivo* была создана конструкция с транспозоном, содержащими ген белка SMC, слитый с геном флуоресцентного белка mMaple2. Это позволило наблюдать за локализацией белка в живых клетках. Он демонстрирует неравномерное распределение в клетках, что косвенно подтверждает его способность связываться с ДНК. Таким образом, белок SMC *U. parvum* проявляет похожие на SMC из других бактерий свойства и, вероятно, может выполнять важную роль в процессе деления.

Важно отметить, что и продукты других генов (*ftsK*, *UPA3_RS01765*, *UPA3_RS02030*) в аналогичных конструкциях с транспозоном демонстрируют неравномерное распределение в клетке. Вероятно, данные белки также являются ДНК-связывающими и могут быть вовлечены в процесс деления.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-04-00760).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОМА ЭНДОМЕТРИЯ

Д. С. Рыбалко^{1,*}, А. Ф. Сайфитдинова^{1,2}, Е. И. Кошель³

¹РГПУ им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

²Международный центр репродуктивной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: rybalkodarya@mail.ru

Исследования микробиоты репродуктивного тракта женщин рутинными методами не позволяли получить исчерпывающих данных о спектре бактерий, населяющих эндометрий в норме и патологии и их влиянии на имплантацию эмбриона и протекание беременности. Развитие молекулярно-генетических методов позволило выявить взаимосвязь между особенностями видового состава микроорганизмов эндометрия и различными аспектами женского репродуктивного здоровья (Moreno et al., 2022). Анализ данных современных исследований позволил сформировать представления о микробиоте эндометрия в норме и патологии, а также составить сводный список родов патогенных бактерий, оказывающих влияние на имплантацию эмбриона. Цель настоящего исследования состояла в исследовании бактериальной ДНК и патогенов в образце эндометрия пациентки с привычным невынашиванием и повторными неудачами беременности в циклах ЭКО методами молекулярно-генетического анализа. На первом этапе проводили ПЦР с универсальными праймерами 515F/806R к участку V4 гена 16S рРНК (Caporaso et al., 2011). Для выявления патогенов эндометрия в исследуемом образце методом ПЦР была разработана тест-система, в которую вошли специфические праймеры к родам *Atopobium* и *Gardnerella* собственного дизайна. Дополнительные данные о количественном составе микроорганизмов были получены на основании данных высокопроизводительного секвенирования. Снижение доли лактобактерий рода *Lactobacillus* до 44.45% и присутствие патогенов рода *Gardnerella* (30.94%) при отсутствии патогенов, характерных для хронического эндометрита, могли быть причиной репродуктивных проблем у данной пациентки. Использование молекулярно-генетических методов для изучения характеристик микрофлоры эндометрия может расширить представления о роли определенных патогенов в нарушении репродуктивного здоровья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Caporaso J.G. et al. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proc. Natl. Acad. Sci. V. 108. Suppl. 1. P. 4516.

Moreno I. et al. 2022. Endometrial microbiota composition is associated with reproductive outcome in infertile patients. Microbiome. V. 10. P. 1.

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОМ-АССОЦИИРОВАННОГО ЭКСПОСОМА У БОЛЬНЫХ РАКОМ КИШЕЧНИКА

Т. Ш. Садеков^{1,*}, А. М. Затевалов¹, О. Г. Жиленкова¹

¹ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

*E-mail: timur-sadekov@mail.ru

Введение. Метаболомика человека изучает метаболиты, участвующие в биохимических реакциях, часть из которых проникает из окружающей среды и относится к экспосому. Часть экспосома можно отнести к микробиом-ассоциированной экспосомике и ее проявлению, которое является следствием множества разнонаправленных процессов и причиной ухудшения состояния больного. Для лечения тяжелых заболеваний реализован системный подход. Системный, интегральный подход в предиктивной диагностике реализуется в обобщении большого массива данных и обработке их методами многомерной статистики и математического моделирования.

Цель работы. Оценка проявлений микробиом-ассоциированной экспосомики у больных раком кишечника.

Материалы и методы. Исследовали кровь пациентов методом ГХ-МС на содержание малых молекул микробного происхождения (SMOM) – гидроксикислот, жирных кислот, стеролов и альдегидов. В исследовании участвовали 42 пациента. В группе сравнения были пациенты, участвовавшие в диспансеризации НИИ им. Г.Н. Габричевского. Образцы крови были собраны в ГКБ № 67 Москвы. Кровь подвергали кислому метанолизу, после чего экстрагировали гексаном, силилировали и вводили в испаритель хроматографа. Смеси разделяли на колонке с фазой FFPA в токе гелия.

Результаты. При онкологическом заболевании снижается концентрация жирных кислот и стеролов. Вклад фосфолипидов учитывается по концентрации октадеценгового альдегида, так как его доля среди альдегидов составляет 82%, а вклад гидроксикислот учитывают как сумму 2,3-гидроксикислот, которые распределены более равномерно. Суммарный уровень малых молекул микробного происхождения в крови, уровень октадеценгового альдегида и сумма 2,3-гидроксикислот могут количественно характеризовать взаимосвязь грамотрицательной и грампозитивной микрофлоры и макроорганизма. Октадеценновый альдегид – маркер бактериального плазмалогена, который входит в состав клеточной стенки видов *Bifidobacterium spp.* и *Clostridium spp.* Бифидобактерии и некоторые клостридии могут разрушать муциновый слой кишечника при приобретенных факторах патогенности. Используя данные о микроорганизме источника малой молекулы, можно характеризовать экспосом по соотношению флотипов, вклад в экспосом анаэробных микроорганизмов, протеолитически активных микроорганизмов и грибов. Использование многомерной статистики позволяет определить специфичность проявления экспосома, характерных для опытной группы, и получить экспосомный отпечаток для более точной характеристики исследуемых групп.

Заключение. Результаты исследования показали, что в крови больных раком кишечника наблюдается снижение проявления экспосома по сравнению с группой сравнения. Это характеризуется обедненным микробиоценозом, который, возможно, формируется при проведении химиотерапии. В крови опытной группы обнаружено увеличение концентрации SMOM, принадлежащих флотипу *Proteobacteria*. Таким образом, экспосом характеризуется двумя факторами: повышенной кишечной проницаемостью и количеством грамотрицательных микроорганизмов.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ АНТИТЕЛА КАК ИНСТРУМЕНТ БОРЬБЫ С МИКРОСПОРИДИОЗАМИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАСЕКОМЫХ

С. А. Тимофеев^{1,*}, И. В. Сендерский¹, В. С. Журавлев¹, В. В. Долгих¹

¹Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

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

Микроспоридии – это облигатные внутриклеточные эукариотические паразиты, освоившие чрезвычайно широкий круг хозяев, от протистов до млекопитающих. Практическое значение микроспоридий обусловлено их важной ролью в качестве регуляторов численности в природных популяциях насекомых-фитофагов. Кроме того, микроспоридии являются опасными патогенами хозяйственно-значимых видов животных и человека. Наибольший ущерб микроспоридии наносят различным отраслям сельского хозяйства, в первую очередь пчеловодству и шелководству, вызывая тяжелое заболевание у медоносных пчел и шелковичных червей – нозематоз. Современные методы борьбы с данной инфекцией крайне ограничены, в част-

ности, наиболее эффективный препарат для борьбы с нозематозом – фуммагиллин некоторое время был признан токсичным для позвоночных и запрещен к использованию в большинстве развитых стран.

Для решения данного вопроса мы предложили подход, основанный на создании рекомбинантных мини-антител (scFv) к жизненно важным белкам паразитов. Потенциальная способность этих антител ингибировать активность данных белков и предотвращать развитие микроспоридий – делает возможным создание трансгенных линий насекомых, устойчивых к микроспоридиозу за счет продукции в организме хозяина вышеупомянутых антител. В качестве белков-мишеней паразитов были выбраны АДФ/АТФ-переносчики пластидно-бактериального типа, полностью обеспечивающие развитие патогена энергией в виде АТФ, а также секретируемая форма гексокиназы микроспоридий, транспортируемая в ядро зараженной клетки с целью регуляции транскрипционной активности генов хозяина. В рамках данного доклада будут представлены полученные за последний год результаты проекта по созданию и отбору искомым scFv молекул с помощью технологии фагового дисплея, а также результаты тестирования влияния каждого антитела на развитие паразитов в клеточной культуре насекомых.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 18-16-00054).

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ *METCHNIKOVELLA* SP. (OPISTHOKONTA: MICROSPORIDIA) ИЗ КИШЕЧНЫХ ГРЕГАРИН *ALITTA VIRENS*

Е. В. Фролова^{1, 2, *}, О. Г. Камышацкая¹, Н. И. Бондаренко², М. П. Райко³, Г. Г. Паскерова²,
А. В. Смирнов², Е. С. Насонова^{1, 2}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

³Центр биоинформатики и алгоритмической биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: uroborospora@gmail.com

Мечниковеллиды – это особая группа микроспоридий, спорообразующих паразитических протистов. Они заражают грегариин из морских аннелид, то есть являются гиперпаразитами. Их споры имеют редуцированный инвазионный аппарат, из-за чего мечниковеллид долгое время считали примитивными микроспоридиями. Жизненный цикл гиперпаразитов включает два типа спорогонии: споры могут формироваться эндогенно под толстой оболочкой “цисты” в ограниченном числе, либо свободно от нее в большом количестве. Форма и размер цист, а также наличие полярных утолщений и нитей – специфичные признаки, по которым выделяют 3–4 рода мечниковеллид. На филогенетических деревьях эта группа образует сестринскую кладу по отношению к каноническим микроспоридиям. Молекулярные данные получены всего для нескольких видов мечниковеллид, однако на основании анализа уже имеющихся сведений можно сделать вывод, что традиционная классификация мечниковеллид, основанная на морфологических признаках цист, не конгруэнтна с филогенетическими реконструкциями.

Мы провели филогеномный анализ консервативных однокопийных протеиновых доменов, предложенных для опистхонтов, а также выполнили филогеномный анализ, используя набор однокопийных ортологов из базы BUSCO Fungi_odb10. Для анализов были отобраны ортологи, идентифицированные в доступных в GenBank геномах и транскриптомах опистоспоридий, грибов и других голомикот, а также в полученных нами геномных данных для мечниковеллиды, обнаруженной в грегариинах из полихеты *Alitta virens*, собранной в Белом море. Морфологически этот вид можно отнести к роду *Metchnikovella*, однако результаты как филогенетического, так и филогеномного анализов сближают его с последовательностями мечниковеллид рода *Amphiamblys*. Такое родство также подтверждается строением инвазионного аппарата, полярный сак и манубриум которого имеют большее сходство с этими структурами представителей рода *Amphiamblys*, нежели видов *Metchnikovella*. Таким образом, обнаруженный вид занял промежуточное положение на дереве мечниковеллид между двумя родами. Дальнейшие исследования разнообразия и филогении мечниковеллид помогут разрешить вопрос о необходимости установления новых родов и пересмотра классификации этой группы организмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 19-74-20136) с использованием оборудования РЦ “Биобанк” и “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ.

ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ, КОДИРУЕМЫЕ ГЕНАМИ *MSMEG_1964* И *MSMEG_5596*, ОБЕСПЕЧИВАЮТ УСТОЙЧИВОСТЬ *M. SMEGMATIS* К ТРИПТАНТРИНАМ

С. Г. Фролова^{1,2,*}, Д. А. Маслов¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Московская обл., Долгопрудный, Россия

*E-mail: frolova.sg@phystech.edu

Распространение лекарственно устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, возбудителя туберкулеза, является глобальной проблемой для здравоохранения и требует разработки противотуберкулезных препаратов (ПТП) с принципиально новыми механизмами действия. Триптантрин – алкалоид природного происхождения, относится к классу индолохинолиновых антибиотиков, и обладает широким спектром биологической активности. Привлекательной особенностью триптантрина, для разработки на его основе ПТП, является его активность в отношении лекарственно устойчивых штаммов *M. tuberculosis*. Ранее *in silico* была предсказана биомишень триптантрина – еноил-(ацил-переносающий белок)-редуктаза (InhA), являющаяся биомишенью ПТП изониазида. Однако, биомишень и механизм резистентности микобактерий к триптантринам еще не были установлены *in vitro*.

Ранее нами было показано, что эффлюкс MmpS5-MmpL5 способен обеспечивать устойчивость к триптантринам. На основе штаммов *M. smegmatis* mc2 155 и *M. smegmatis* Δmmp5 (штамм с делецией оперона *mmpS5-mmpL5*) нами получены и охарактеризованы спонтанные устойчивые мутанты к 8-фтортриптантрину. Сравнительный геномный анализ мутантов выявил мутации в генах *MSMEG_1963*, *MSMEG_4427* и *MSMEG_5597*. Чтобы доказать роль этих генов в формировании устойчивости к триптантринам, мы, методом гомологичной рекомбинации с использованием суицидной векторной системы p2NIL/pGOAL19, сконструировали рекомбинантные штаммы *M. smegmatis*, несущие мутации в генах *MSMEG_1963*, *MSMEG_4427* и *MSMEG_5597*. Рекомбинантные штаммы с мутациями в *MSMEG_5597* и *MSMEG_1963* имели наивысший уровень устойчивости к триптантринам, однако мутация в *MSMEG_4427* не приводила к изменению фенотипа устойчивости. Анализ генетического окружения генов *MSMEG_1963* и *MSMEG_5597* показал, что соседние с ними гены *MSMEG_1964* и *MSMEG_5596* кодируют оксидоредуктазы. С помощью количественного ПЦР в реальном времени мы показали, что мутация в гене *MSMEG_5597* повышает одновременно его собственную экспрессию и гена *MSMEG_5596*, в то время как мутация в *MSMEG_1963* приводит только к сверхэкспрессии *MSMEG_1964*. Возможно, оксидоредуктазы могут инактивировать молекулу триптантрина, делая ее нетоксичной. Также мы проверили гипотезу об участии фермента InhA в механизме резистентности. Обнаружено, что сверхэкспрессия генов InhA *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* (*MSMEG_3151* и *Rv1484* соответственно) в составе экспрессионного вектора pMIND не влияет на устойчивость *M. smegmatis* к триптантринам. Следовательно, InhA не является биомишенью триптантринов.

Таким образом, мы показали, что гены *MSMEG_5597* и *MSMEG_1963*, являющиеся транскрипционными регуляторами, приводят к сверхэкспрессии оксидоредуктаз, кодируемых генами *MSMEG_5596* и *MSMEG_1964*, что обеспечивает устойчивость *M. smegmatis* к триптантринам. Также мы опровергли гипотезу, что InhA является биомишенью триптантрина.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых российских ученых – кандидатов наук МК-797.2020.4.

ПОИСК ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ-ТРИГГЕРОВ И ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ СИСТЕМЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА PARIS

А. А. Чеченина^{1,*}, М. А. Скутель², А. Б. Исаев²

¹Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”,
Факультет биологии и биотехнологии, Москва, Россия

²Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

*E-mail: che4enina.a@yandex.ru

Бактериофаги – вирусы, инфицирующие бактерий – являются самыми распространенными биологическими объектами на Земле и оказывают значительное влияние на эволюцию прокариот. За миллионы лет сосуществования с бактериофагами, бактерии приобрели множество систем защиты, при этом быстрая скорость эволюции фагов способствует появлению анти-защитных стратегий. Некоторые бактерии несут абортивные системы защиты, которые в случае инфекции фагом индуцируют гибель или переход клетки в персистентное

состояние, что препятствует размножению вируса. При этом механизмы активации таких систем в большинстве случаев не установлены.

PARIS – недавно описанная система бактериального иммунитета с предполагаемым абортивным механизмом. Для PARIS впервые был предложен механизм активации иммунного ответа при распознавании анти-рестрикционных белков, что предполагает кооперацию данной системы с другими системами защиты, являющимися мишенью действия анти-рестрикции. Мы подтвердили абортивный фенотип PARIS, показав, что ДНК-мимикрирующий белок Osg фага T7 вызывает токсичность системы в отсутствие вирусной инфекции. Наблюдения PARIS+ клеток, окрашенных пропидий иодидом, показали, что экспрессия Osg приводит к быстрой гибели всей популяции, при этом в клетках, окрашенных DAPI, наблюдалось снижение флуоресцентного сигнала, что может предполагать деградацию ДНК в качестве механизма токсичности.

PARIS состоит из 2 компонентов: ArgA – белка с АТФазным SMC-доменом и ArgB, содержащего нуклеазный TOPRIM-домен. Структурное моделирование данных белков показало высокую степень сходства с нуклеазой OLD фага P2, также содержащей домены SMC и TOPRIM. Ранее было показано, что OLD является защитным белком, предположительно активирующимся при распознавании репликативных интермедиатов фага λ . Мы предположили, что PARIS и OLD могут представлять собой варианты одной системы, однако вместо распознавания ДНК, как в случае OLD, SMC-домен в составе ArgA белка оказался приспособлен к распознаванию ДНК-мимикрирующих белков. Исходя из этого можно было ожидать связывания Osg именно с ArgA белком системы PARIS. Эта гипотеза была подтверждена при помощи pull-down эксперимента со strep-тагированным белком Osg и TOPRIM-мутантом PARIS, не способным вызывать токсичность.

Мы также предположили, что система PARIS может быть использована для поиска новых анти-рестрикционных белков. Был проведен скрининг более 60 бактериофагов из которых удалось отобрать 10, активирующих PARIS-защиту, что предполагает наличие у данных фагов ДНК-мимикрирующих белков. В частности, фаг T5 и некоторые T5-подобные фаги, для которых известен феномен устойчивости к множеству Р-М систем, вызывали PARIS-ответ. Была проведена селекция мутантных штаммов фага T5, утративших способность активировать PARIS. Секвенирование данных мутантов позволит идентифицировать анти-рестрикционный компонент фага T5.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-14-00004) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-10-2021-114).

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИ-РЕСТРИКЦИОННЫХ МЕХАНИЗМОВ ГЕНОВ *ARDB* И *ARDD*

Д. Д. Яновская^{1, *}, А. Б. Исаев²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия

²Сколковский институт науки и технологии, Москва, Россия

*E-mail: yanovskaya.dd@phystech.edu

Горизонтальный перенос генов (HGT) играет важную роль в эволюции прокариот и вносит свой вклад в увеличение генетического разнообразия и приспособленности бактериальных клеток. Обмен генетическим материалом часто опосредован мобильными элементами, такими как бактериофаги (трансдукция), транспозоны или плазмиды (трансформация). При этом у бактерий имеются иммунные системы, препятствующие проникновению чужеродной ДНК в клетку и сдерживающие распространение мобильных элементов. В частности, системы рестрикции-модификации (Р-М) атакуют ДНК, не содержащую модификаций, характерных для бактериального генома. Р-М ферменты типа I представляют собой комплексы, содержащие две субъединицы эндонуклеазы рестрикции (hsdR), необходимые для расщепления ДНК, одну субъединицу узнавания сайтов (hsdS) и две субъединицы метилтрансферазы (hsdM), которые катализируют реакцию метилирования. В зависимости от статуса метилирования ДНК этот комплекс может функционировать либо как эндонуклеаза рестрикции, либо как метилаза. Неметилированная ДНК является мишенью для рестрикции, полуметилированные молекулы являются мишенью для дальнейшего метилирования, а полностью метилированная ДНК невосприимчива к рестрикции.

В свою очередь, бактериофаги и другие мобильные элементы выработали стратегии избегания или подавления иммунных систем бактерий и известно несколько классов генов *ard*, активных против Р-М систем I типа. Белки ArdV кодируются плазмидами и конъюгативными элементами и несмотря на то, что известна структура этих белков, все еще не предложен механизм их *in vivo* действия. При этом, в условиях *in vitro* реакции не удавалось обнаружить ингибирования активностей Р-М системы EcoKI в присутствии ArdV. Для того чтобы выяснить, взаимодействует ли ArdV (R64) с какими-либо клеточными компонентами, мы провели pull-down

эксперимент, используя Strep-тагированный вариант белка. Нам удалось обнаружить связывание с ArdB HsdR субъединицы EcoKI, но не других Hsd белков. Это позволяет предложить модель, согласно которой *in vivo* ArdB захватывает свободную HsdR субъединицу, препятствуя сборке рестрикционных комплексов.

Еще один *ard*-ген с неустановленным механизмом действия – *ardD* – встречается в группе транспозонов, кодирующих также гены устойчивости к тяжелым металлам, в частности в Tn5053. Ранее было предсказано, что белок ArdD кодируется геном расположенным на антисмысловой цепи другого гена – *miA*, однако, помимо мутаций, нарушающих предполагаемый *ardD* локус, другие мутации в транспозоне также приводили к потере анти-рестрикционной активности. Мы решили проверить роль гена *ardD* и показали, что внесение преждевременного стоп-кодона или даже удаление всего гена не влияют на анти-рестрицию, что ставит под сомнение существование анти-рестрикционного белка ArdD. В настоящее время исследуются альтернативные пути подавления Р-М защиты, связанные с Tn5053.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 22-14-00004) и Министерства науки и высшего образования (№ 075-10-2021-114).